

Université de Sherbrooke

Un élément intronique dans l'ARN pré-messager de hnRNP A1 lie SRp30c et
influence l'utilisation de sites d'épissage 3'

Par

Martin Simard

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

En vue de l'obtention du grade de

philosophae doctor (Ph.D.) en microbiologie

27 novembre 2001



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-612-85178-8

Our file Notre référence

ISBN: 0-612-85178-8

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

Canada

*« Time and concentration allow the intellect to perceive a
ray of light in the darkness of the most complex problem. »*

Santiago Ramón y Cajal

1897

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	I
Liste des figures	III
Liste des abréviations	IV
Résumé	V
Introduction.....	1
L'épissage: un mécanisme complexe et de haute précision.....	1
Modulation de la sélection des sites d'épissage: Épissage alternatif	6
Deux classes d'éléments impliqués dans la régulation de la sélection des sites d'épissage: les activateurs et les inhibiteurs	7
I-Éléments activateurs	10
II-Éléments inhibiteurs	15
La protéine hnRNP A1	18
Chapitre I.....	24
Préambule.....	24
Chapitre II.....	36
Préambule.....	36
Discussion.....	76
L'élément CE9 réprime l'utilisation d'un site d'épissage 3'	77
L'activité de CE9 est médiée par la liaison de la protéine SRp30c	79
La modulation des sites d'épissage communs comme stratégie pour moduler l'épissage alternatif.....	85
De multiples éléments pour contrôler l'épissage alternatif de l'exon 7B.....	86

Conclusions.....	91
Remerciements.....	93
Références	94
Annexe I	113
Préambule.....	113
Annexe II	123
Préambule.....	123

LISTE DES FIGURES

Figure 1.....	2
Figure 2.....	4
Figure 3.....	5
Figure 4.....	9
Figure 5.....	11
Figure 6.....	12
Figure 7.....	19
Figure 8.....	21
Figure 9.....	82
Figure 10.....	87
Figure 11.....	90
Tableau 1	13

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CE	"Conserved Element"
hnRNP	"heterogenous nuclear RiboNucleoProtein"
pb	paire de bases
PTB	"Polypyrimidine Tract Binding protein"
RRM	"RNA Recognition Motif"
SELEX	"Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment"
SF1/mBBP	"Splicing Factor 1/mammalian Branch point Binding Protein"
snRNP	"small nuclear RiboNucleoParticle"
U2AF	"U2 snRNP Auxiliary Factor"

RÉSUMÉ

L'épissage alternatif des ARN pré-messagers est une modalité importante régissant l'expression des gènes chez les eucaryotes supérieurs. Outre la contribution des signaux d'épissage, la sélection des sites d'épissage est souvent contrôlée par d'autres éléments présents dans l'ARN pré-messager. Cependant, la nature de ces séquences, l'identité des facteurs s'y liant et les mécanismes d'action demeurent encore mal connus. Afin d'étudier les séquences régulatrices et les facteurs cellulaires pouvant contrôler l'épissage alternatif chez les mammifères, notre laboratoire utilise le gène hnRNP A1. L'exclusion ou l'inclusion de l'exon 7B dans l'ARN pré-messager de hnRNP A1 permet de produire deux ARN messagers encodant respectivement la protéine hnRNP A1 et hnRNP A1B. Les séquences introniques flanquant l'exon alternatif 7B contiennent plusieurs régions hautement conservées chez l'humain et la souris suggérant un rôle important joué par ces régions. Notre laboratoire a identifié quatre de ces régions influençant l'épissage alternatif de l'exon 7B.

Le but de mon étude était de caractériser une nouvelle région intronique, CE9, située en aval de l'exon 7B. L'élément CE9 a la capacité de moduler l'épissage *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus indiquent que CE9 est un régulateur négatif affectant l'utilisation d'un site d'épissage 3'. Contrairement à la majorité des régulateurs négatifs connus, l'élément CE9 n'empêche pas la reconnaissance du site d'épissage 3' car la liaison du snRNP U2 et du snRNP U4 a toujours lieu malgré l'inhibition de l'épissage. Plusieurs évidences suggèrent que l'activité de CE9 est médiée par une protéine: CE9 agit sur divers substrats, l'ajout d'ARN compétiteur

correspondant à CE9 rétablit le profil d'épissage affecté par la présence de CE9, et l'élément CE9 forme un complexe spécifique avec des protéines dans un extrait cellulaire. L'utilisation d'une chromatographie par affinité a permis d'isoler la protéine SRp30c. SRp30c est capable d'interagir de façon spécifique avec CE9 et promouvoit la répression de l'épissage seulement lorsqu'un ARN pré-messager contient CE9. Ces résultats suggèrent une contribution de la protéine SRp30c dans la fonction de l'élément CE9.

Cette étude a permis d'identifier pour la première fois une séquence intronique réprimant la sélection d'un site d'épissage 3' commun. De plus, le rôle de la protéine SRp30c dans la fonction de CE9 est la première fonction spécifique associée à cette protéine. Cette découverte démontre la versatilité des membres des protéines SR dans la régulation de l'épissage alternatif.

INTRODUCTION

L'épissage: un mécanisme complexe et de haute précision

La transcription de l'ADN en un brin d'ARN initie l'enchaînement de divers processus cellulaires conduisant à la production d'un ARN mature, l'ARN messager, qui servira à la production de protéines. Parmi ces processus, l'épissage représente l'un des plus importants puisqu'un dérèglement de cette machinerie conduirait à la synthèse de protéines incomplètes ou même néfastes pour l'intégrité de la cellule. Ce processus moléculaire excise les introns de l'ARN pré-messager et permet de joindre les portions codantes de l'ARN (exons) produisant l'ARN messager qui sera traduit dans le cytoplasme par le ribosome. La machinerie d'épissage doit être guidée par la séquence nucléotidique de l'ARN afin de bien choisir les régions d'un gène qui seront excisées suite à la synthèse de l'ARN pré-messager par l'ARN polymérase de type II. De la levure aux mammifères, chacune des extrémités des introns est définie par son homologie avec des séquences consensus, soit le site d'épissage 5', le site de branchement et le site d'épissage 3' (Figure 1). La reconnaissance de ces sites d'épissage par des facteurs cellulaires initie l'assemblage du spliceosome. Le spliceosome est constitué de cinq petits complexes ribonucléoprotéiques nucléaires soit les snRNP U1, U2, U4, U5 et U6 ainsi que d'un grand nombre de protéines non directement associées aux snRNPs. Les extrémités de l'intron sont initialement reconnues par le snRNP U1 et U2AF formant le complexe d'engagement ou complexe E (Figure 1).

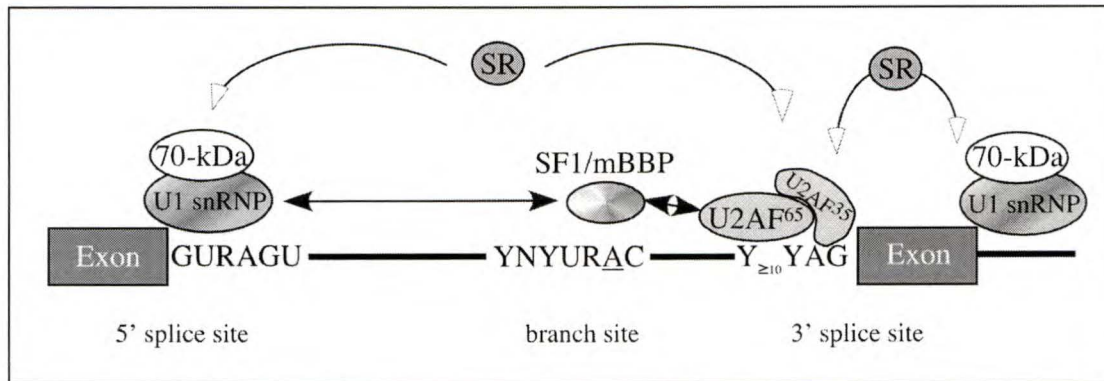


Figure 1. Sites d'épissage et facteurs impliqués dans la formation initiale du spliceosome. Les séquences indiquées représentent les séquences consensus des sites d'épissage des mammifères. Y= pyrimidines (C ou U), R= purines (A ou G). L'adénosine du site de branchement est soulignée. Le site d'épissage 5' et le site d'épissage 3' sont reconnus respectivement par le snRNP U1 et la protéine U2AF. Les flèches blanches indiquent que certaines protéines SR peuvent interagir avec la protéine U1-70kDa et U2AF³⁵ favorisant la définition de l'intron et de l'exon. La région du site de branchement est reconnue initialement par SF1/mBBP. L'interaction entre SF1/mBBP et U2AF et entre BBP de la levure et snRNP U1 suggère l'importance de SF1/mBBP pour favoriser la définition de l'intron (flèches noires). Tiré de Hutchison *et al*, 2000.

Le snRNP U1 interagit avec le site d'épissage 5' via une interaction ARN-ARN impliquant la région 5' de la composante ARN de U1. La région 3' de l'intron est reconnue par le facteur auxiliaire du snRNP U2 (appelé U2AF) constitué de deux sous-unités, U2AF⁶⁵ et U2AF³⁵. La sous-unité U2AF⁶⁵ reconnaît la région riche en pyrimidines retrouvée entre le site de branchement et le site d'épissage 3'. U2AF³⁵ est la portion du facteur U2AF qui s'associe de façon spécifique au dinucléotide AG du site d'épissage 3' (Merendino *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999; Zorio et Blumenthal, 1999). La protéine U2AF³⁵ et la protéine de 70 kDa associée au snRNP U1 (U1-70k) contiennent un domaine riche en dipeptides arginine et sérine (domaine RS) qui leur permet d'interagir avec des domaines similaires retrouvés chez les membres de la famille des protéines SR. Étant donné que certaines protéines SR peuvent interagir simultanément avec les protéines U1-70k et U2AF³⁵ (Wu et Maniatis, 1993), il a été proposé que les protéines SR servent d'intermédiaires pour la communication entre le

site d'épissage 5' et le site d'épissage 3' afin de définir la région intronique (Figure 1 et Chabot, 1996; Reed, 1996). Ces interactions peuvent aussi survenir lors de la définition de l'exon où la liaison du snRNP U1 au site d'épissage 5' pourrait stimuler la liaison de U2AF au site d'épissage 3' situé en amont (Figure 1 et Berget, 1995). Certaines évidences suggèrent que le site de branchement est initialement reconnu par la protéine SF1/mBBP (Berglund et al., 1997) et que cette interaction est facilitée via une interaction avec U2AF⁶⁵ (Berglund et al., 1998). L'interaction de SF1/mBBP avec U2AF et snRNP U1 a permis de proposer un second modèle de communication entre les sites d'épissage d'un intron (flèches noires dans la Figure 1 et Abovich et Rosbash, 1997).

Une fois les frontières de l'intron définies, le snRNP U2 déplace SF1/mBBP et s'associe au site de branchement avec l'aide de l'ATP pour former le complexe A. Das et collaborateurs (2001) ont récemment montré que l'association du snRNP U2 à l'ARN pré-messager pourrait aussi survenir lors de la formation du complexe d'engagement. Dans ce cas, le snRNP U2 serait associé au complexe E sans l'apport d'une source d'énergie et sans la présence d'une interaction stable avec le site de branchement (Figure 3). Les auteurs proposent que le snRNP U2 s'associe faiblement avec l'ARN pré-messager grâce à une de ses protéines associées, SF3b. Par la suite, la liaison au site de branchement est stabilisée à l'aide d'un processus nécessitant une source d'ATP.

Le complexe suivant, le complexe B, est formé lorsque la liaison des snRNPs U4, U6 et U5 remplace la liaison du snRNP U1 au site d'épissage 5' et interagit avec la région du site d'épissage 3'. Suite à ce recrutement, le remodelage des interactions

ARN-ARN et ARN-protéines entraîne une modification de la structure de l'ARN pré-messager qui favorisera l'initiation de la première étape de transestérification (Figure 2).

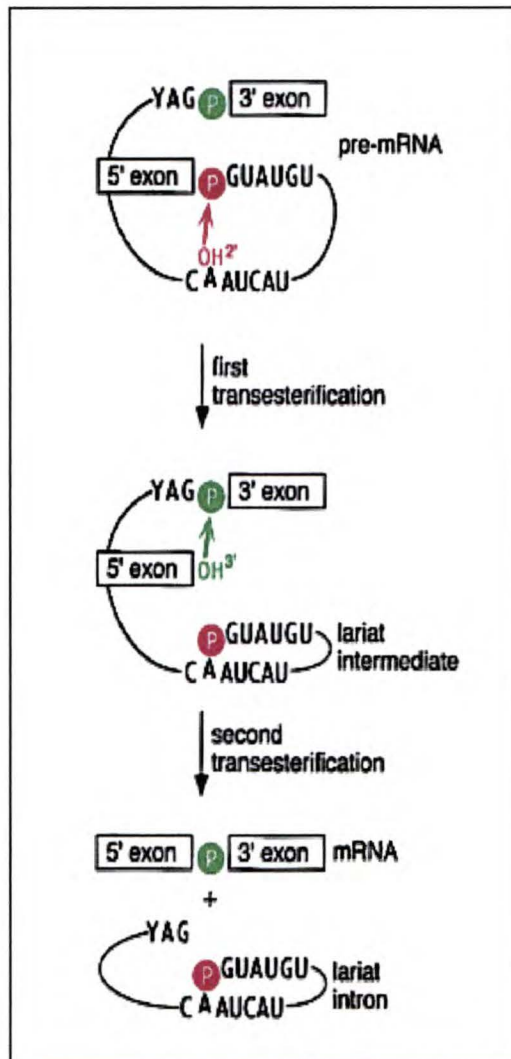


Figure 2. Épissage d'un ARN pré-messager via deux étapes de transestérification. En rose sont représentés les réactifs de la 1^{ère} étape de transestérification et en vert, les réactifs de la 2^{ème} étape de transestérification. Les introns sont représentés sous forme de ligne avec les séquences consensus de *S. cerevisiae*. Tiré de Staley & Guthrie, 1998.

Cette vision séquentielle de la formation du spliceosome est présentement en révision suite à une étude récente qui révèle la présence de nouvelles étapes intermédiaires (Maroney et al., 2000). Cette étude indique que le tri-snRNP U4/U6/U5 interagit avec le site d'épissage 5' et les régions exoniques adjacentes avant la formation du complexe B (Figure 3). Ces interactions s'établiraient avant la liaison stable du snRNP U2 et semblent guidées en partie par une protéine associée au snRNP U5, soit Prp8/220. Les auteurs proposent que le snRNP U1 et le complexe snRNP U4/U6/U5 définissent le site d'épissage 5' avant d'interagir avec le snRNP U2 et le site d'épissage 3'.

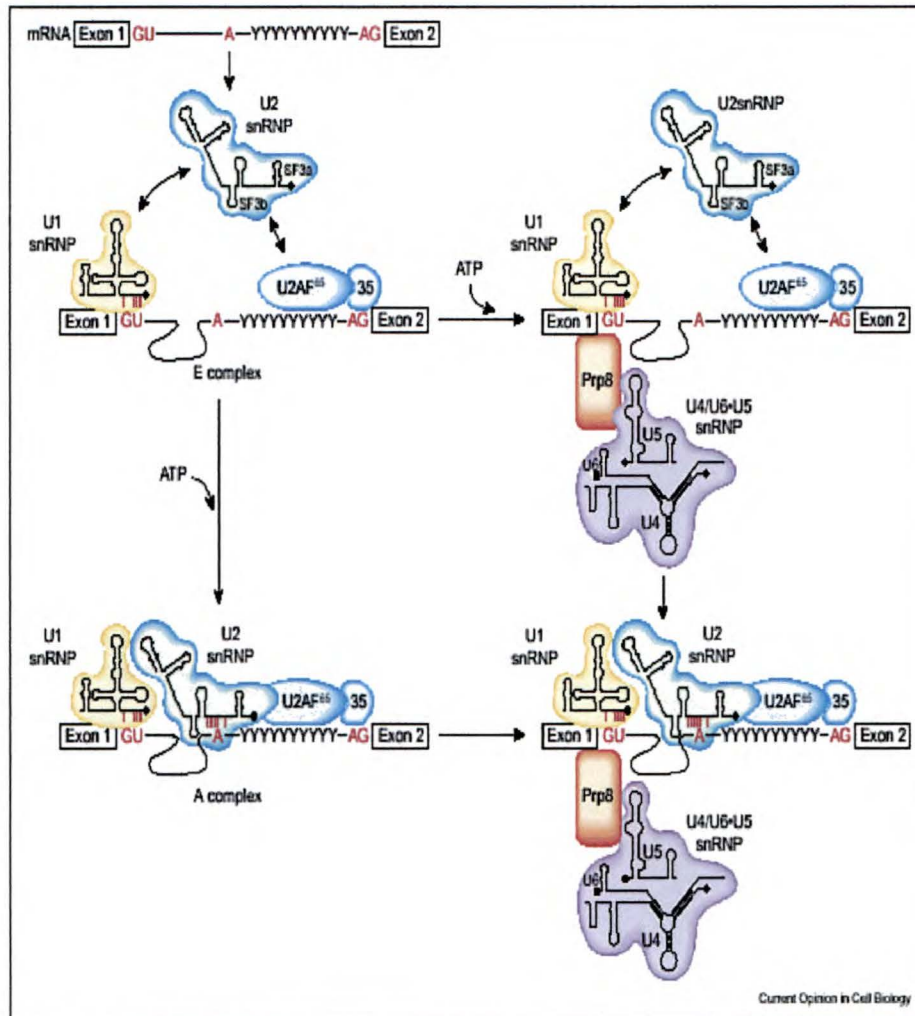


Figure 3. Intermédiaires de l'assemblage précoce du spliceosome. Dans le complexe E, le snRNP U1 lie le site d'épissage 5' (GU en rouge) et le snRNP U2 lie faiblement près du site d'épissage 3' (AG en rouge) probablement via l'interaction entre SF3b et U2AF et/ou snRNP U1. En présence d'ATP, le tri-snRNP U4/U6/U5 lie la région du site d'épissage 5' et le snRNP U2 lie le site de branchement (A en rouge). Dans ce modèle, la formation du complexe B (non montré) n'est pas une conséquence de l'association du tri-snRNP avec l'ARN pré-messager mais plutôt d'une stabilisation suite à un réarrangement des interactions ARN-ARN incluant le remplacement de U1 par U6 au site d'épissage 5'. Y: pyrimidine. Tiré de Hasting et Krainer, 2001.

Étant donné le rôle important joué par la reconnaissance des sites d'épissage dans la définition des exons et des introns d'un ARN pré-messager, ce processus constitue une cible de choix afin de moduler l'épissage.

Modulation de la sélection des sites d'épissage: Épissage alternatif

Le choix des signaux d'épissage chez un ARN nouvellement synthétisé est une façon efficace pour la cellule d'affecter la fonction de ses gènes. Un seul gène peut permettre la synthèse de diverses protéines simplement par une sélection différente des sites d'épissage.

La première ébauche de la séquence du génome humain a révélé toute l'importance de l'épissage alternatif en tant que générateur de la complexité et de la diversité protéique de l'être humain. Le nombre de gènes codant pour des protéines dans notre génome est seulement 2 à 3 fois plus grand que le nombre retrouvé chez la drosophile, le nématode ou la plante. L'ébauche de la séquence du chromosome 22 permet d'estimer que près de 59% des gènes de ce chromosome sont épissés de façon alternative (Consortium, 2001). Plusieurs gènes possèdent plus de deux et potentiellement plusieurs milliers d'isoformes d'ARN messagers épissés alternativement. L'un des meilleurs exemples de la diversité produite grâce à l'épissage alternatif est relié à la capacité de notre oreille à capter un large spectre de fréquences sonores. Chacune des cellules ciliées de l'oreille interne a la faculté de détecter une fréquence sonore spécifique. L'ensemble des réponses générées par l'excitation de ces cellules est interprétée comme un son. L'aptitude de ces cellules à répondre à une fréquence sonore définie est produite en partie par l'épissage alternatif du gène *slo*. On retrouve au moins 8 événements d'épissage alternatif conservés chez tous les vertébrés dans l'ARN pré-messager de *slo* (revu dans Graveley 2001). Une estimation basée sur le fait que chacun de ces événements d'épissage alternatif peut

être contrôlé de façon indépendante, établit à plus de 500 ARN messagers différents pouvant être produits (pour d'autres exemples voir Graveley, 2001).

La grande majorité des protéines humaines proviennent d'un évènement d'épissage alternatif. La compréhension des mécanismes contrôlant la sélection des sites d'épissage chez les cellules de mammifères représente un défi important de la biologie contemporaine.

Deux classes d'éléments impliqués dans la régulation de la sélection des sites d'épissage: les activateurs et les inhibiteurs

Les résultats accumulés au cours des dernières années indiquent qu'une grande variété de séquences retrouvées dans les pré-ARNm (ARN messagers précurseurs) peuvent soit activer soit inhiber l'utilisation d'un site d'épissage (revus dans Black, 2000; Chabot, 1996; Lopez, 1998; Smith et Valcarcel, 2000). Les éléments activateurs favorisent l'utilisation d'un site d'épissage adjacent et peuvent même favoriser l'inclusion d'un exon dans un ARN messenger. La fonction des éléments inhibiteurs est de diminuer ou d'empêcher la sélection d'un site d'épissage. La contribution de ces éléments régulateurs peut être essentielle afin d'assurer l'utilisation des bons sites d'épissage dans le cas d'ARN messagers qui sont toujours épissés de la même façon. Plusieurs séquences ressemblant à un site d'épissage se retrouvent dans un ARN pré-messenger. Une étude récente a apporté de nouvelles observations permettant d'expliquer pourquoi ces sites d'épissage ne sont pas utilisés. Lorsque des fragments provenant du génome humain de taille variant de 50 à 250 pb sont insérés dans un exon, ces fragments empêchent l'inclusion de cet exon dans

l'ARN messenger dans plus de 30% des cas. Par contre, seulement 3% des séquences provenant du génome de *Escherichia coli* inhibent l'inclusion d'un exon *in vivo*. Les séquences du génome humain semblent donc composées majoritairement de séquences inhibitrices. La présence d'inhibiteurs près de sites d'épissage permettrait d'empêcher l'utilisation des sites inadéquats (Fairbrother et Chasin, 2000). D'autre part, les activateurs peuvent stimuler l'utilisation de sites d'épissage faibles (qui s'éloignent en similarité de la séquence consensus). On retrouve ces activateurs dans plusieurs exons contenus dans une grande variété d'ARN messagers (Mayeda et al., 1999; Schaal et Maniatis, 1999a).

Le nombre grandissant d'études sur l'épissage alternatif a mis en évidence l'importance d'une coordination entre diverses séquences inhibitrices et activatrices (pour exemples voir Figure 4 et Amendt et al., 1994; Ashiya et Grabowski, 1997; Blanchette et Chabot, 1999; Carstens et al., 1998; Côté et Chabot, 1997; Côté et al., 1999; Del Gatto et Breathnach, 1995; Del Gatto et al., 1997; Gallego et al., 1992; Gooding et al., 1998; Huh et Hynes, 1993; Kuo et Norton, 1999; Modafferi et Black, 1999; Ryan et Cooper, 1996; Staffa et Cochrane, 1995; van Oers et al., 1994). La présence de plusieurs éléments régulateurs serait essentielle à la modulation de l'épissage d'un ARN pré-messenger répondant à une grande variété d'effecteurs histos spécifiques et développementaux.

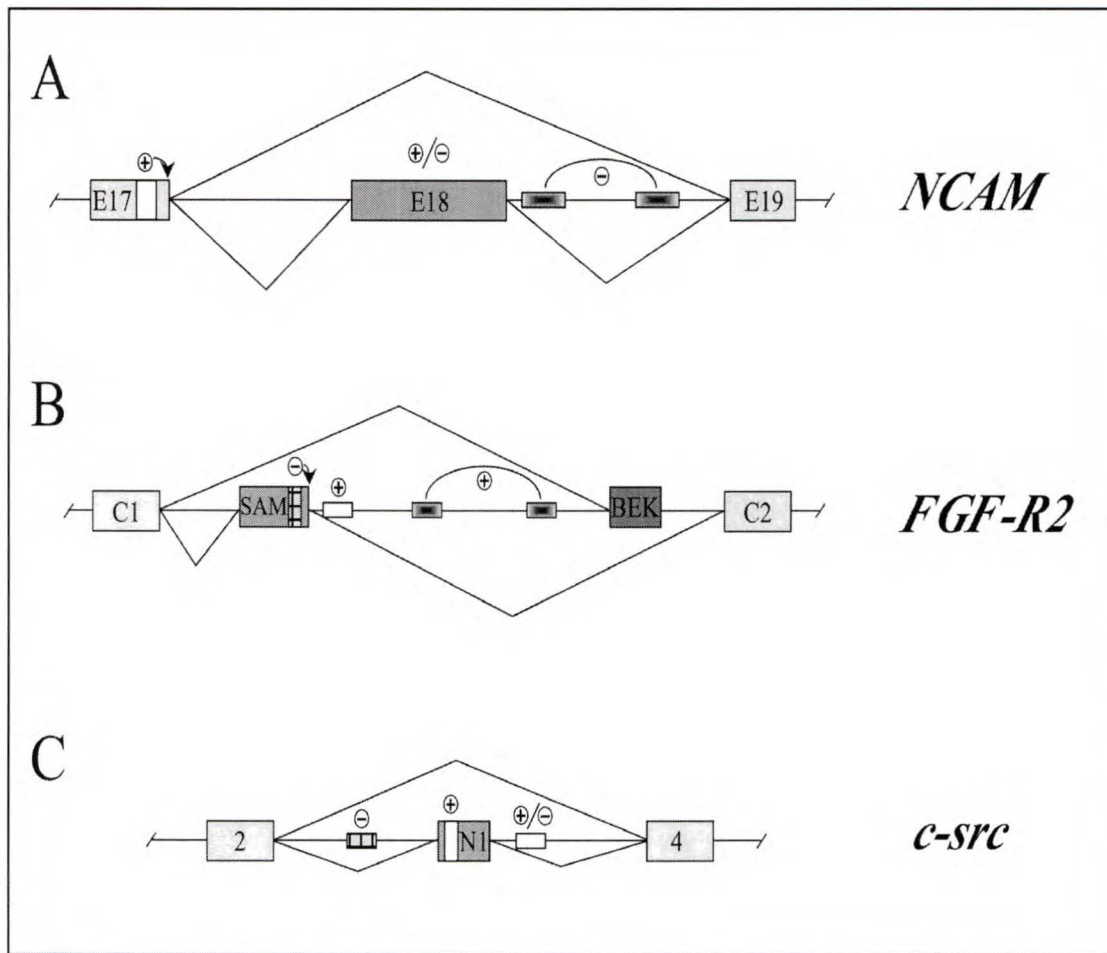


Figure 4. La coordination d'éléments positifs et négatifs permet de moduler l'inclusion ou l'exclusion d'un seul exon. Trois exemples de gènes de mammifères où plusieurs éléments régulateurs sont importants. **A:** L'exclusion de l'exon 18 du gène *NCAM* dans les cellules non-neuronales est contrôlée par au moins trois séquences régulatrices. Deux séquences en aval de cet exon forme un duplexe ARN-ARN empêchant l'épissage E18/E19 (Côté *et al*, 1997) et un élément activateur lié par une protéine SR promouvoit l'utilisation du site d'épissage 5' de l'exon constitutif 17 au détriment du site d'épissage 5' de l'exon 18 (Côté *et al*, 1999). Il existe d'autres régions régulatrices dans l'exon 18, mais leur caractérisation n'est pas complétée (Côté, 1998). **B:** L'inclusion de l'exon alternatif K-SAM du gène *FGF-R2* est aussi régulé par au moins quatre éléments. Deux éléments introniques forment un duplexe ARN-ARN qui favorise l'inclusion de l'exon SAM (Del Gatto *et al*, 1997). Une autre séquence près du site d'épissage 5' de K-SAM est liée par TIA-1 et favorise l'utilisation de ce site (Del Gatto-Konczak *et al*, 2000; Le Guiner *et al*, 2001). Un élément négatif retrouvé dans l'exon est lié par hnRNP A1 et empêche l'inclusion de K-SAM (Del Gatto-Konczak *et al*, 1999). **C:** L'inclusion de l'exon N1 du gène *c-src* dans les cellules neuronales est régulée par au moins 3 régions. La région activatrice située en aval de l'exon N1 est liée par un complexe de protéines incluant les protéines hnRNP H, hnRNP F, KSRP et un isoforme neuronal de PTB (Chou *et al*, 1999; Markovtsov *et al*, 2000; Min *et al*, 1995; Min *et al*, 1997). Dans des cellules non-neuronales, cette même séquence semble liée par PTB et inhibe l'inclusion de l'exon N1 (Chou *et al*, 2000). La région inhibitrice située en amont de l'exon N1 est liée par PTB (Chan *et al*, 1997; Chou *et al*, 2000). Une région activatrice se retrouve aussi dans l'exon N1 (Modafferi et Black, 1999).

I-Les éléments activateurs

La grande majorité des régions activatrices identifiées à ce jour a été retrouvée dans les exons. Il existe deux types d'éléments activateurs exoniques: les éléments activateurs riches en purines et les éléments activateurs riches en adénosine/cytosine (A/C).

Les éléments riches en purines recrutent des membres de la famille des protéines SR. Le premier exemple de ce type a été l'élément activateur retrouvé dans l'exon alternatif EDIIIa du gène fibronectine (Lavigne et al., 1993). Cet élément favorise l'inclusion de l'exon EDIIIa (Mardon et al., 1987). On retrouve dans cet exon une courte séquence de neuf nucléotides qui recrute une protéine SR et favorise l'utilisation du site d'épissage 3'. La présence de cet élément est associée à une augmentation de la liaison du snRNP U2 au site de branchement (Lavigne et al., 1993). D'autres exemples appuient l'idée que le recrutement de protéines SR aux régions activatrices exoniques permet d'augmenter la liaison du facteur U2AF au site d'épissage 3' situé en amont (Staknis et Reed, 1994; Wang et al., 1995) (Figure 5A).

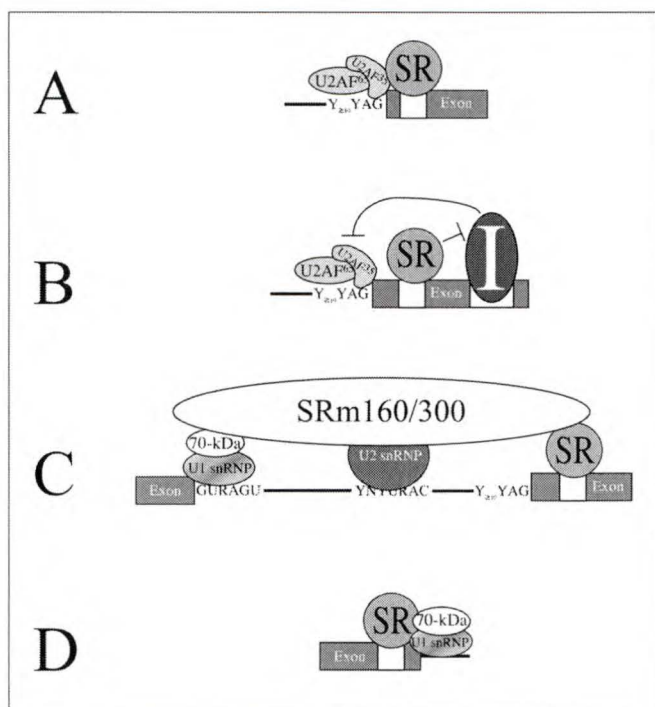


Figure 5. Activation via des séquences exoniques liées par les protéines SR. **A:** Modèle de recrutement de U2AF. La région activatrice est liée par une protéine SR et interagit avec le domaine RS de U2AF³⁵ et favorise le recrutement de U2AF à l'ARN pré-messager. **B:** Modèle inhibiteur. La liaison d'une protéine SR empêche l'inhibiteur d'épissage (I) d'inhiber la reconnaissance du site d'épissage 3'. **C:** Modèle coactivateur. La région activatrice agit via une interaction avec le coactivateur d'épissage SRm160/300 qui interagit avec les snRNP U1 et U2. Certaines interactions peuvent être indirectes. **D:** Le recrutement du snRNP U1 au site d'épissage 5'. Dans ce modèle, la protéine SR lie une séquence en amont du site d'épissage 5' et permet la liaison du snRNP U1 via une interaction avec U1-70K.

Parfois, on retrouve des éléments activateurs qui sont liés par des protéines SR et qui favorisent la sélection du site d'épissage 3' sans affecter la liaison de U2AF au site d'épissage 3' (Kan et Green, 1999; Li et Blencowe, 1999). Dans le cas de la région activatrice exonique retrouvée

dans l'exon M2 du gène *IgM*, les auteurs proposent que la liaison des protéines SR à cette région bloquerait un élément inhibiteur adjacent (Kan et Green, 1999) (Figure 5B). Dans certaines conditions, la région activatrice

pourrait fonctionner via le coactivateur d'épissage SRm160/300 capable d'interagir avec le snRNP U1 et le snRNP U2 (Eldridge et al., 1999) (Figure 5C). Finalement, certains résultats indiquent que les activateurs d'épissage peuvent aussi stimuler des événements ayant lieu après la première étape de transestérification (Chew et al., 1999).

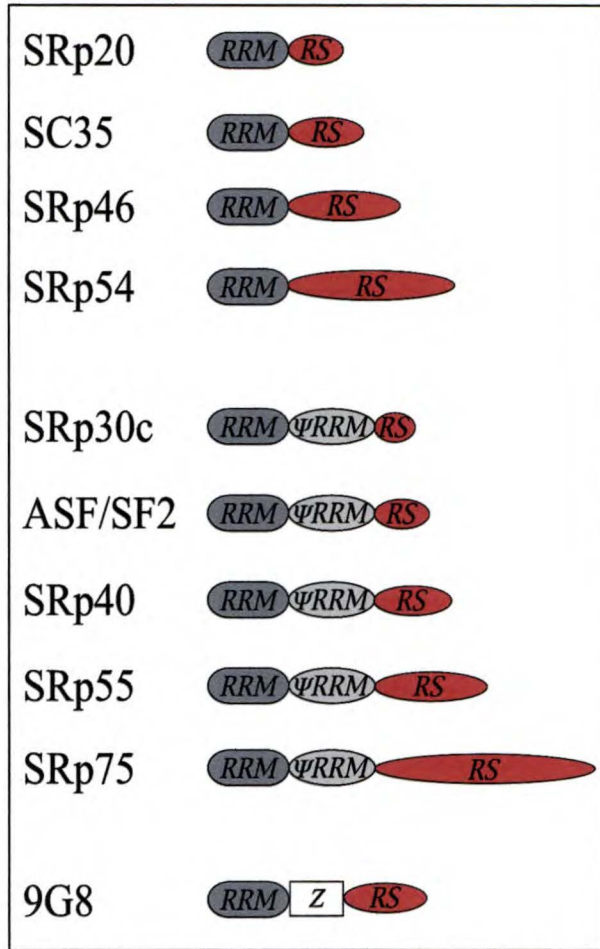


Figure 6. Famille des protéines SR. Représentation schématique des membres de la famille SR retrouvés chez les mammifères. RRM: motif de liaison à l'ARN; ψRRM: motif atypique mais structurellement relié aux RRM; RS: région riche en résidus sérine et arginine; Z: « Zinc-knuckle ».

Dans d'autres cas, la liaison de protéines SR à proximité d'un site d'épissage 5' pourrait favoriser la sélection de ce site en facilitant le recrutement du snRNP U1 (Bourgeois et al., 1999; Côté et al., 1999; Elrick et al., 1998; Eperon et al., 1993; Humphrey et al., 1995; Kohtz et al., 1994; Selvakumar et Helfman, 1999) (Figure 5D).

Jusqu'à présent chez l'homme, on a identifié dix protéines SR différentes (Figure 6 et revu dans Graveley, 2000).

Parmi les membres de cette famille, certains possèdent une séquence spécifique de liaison à l'ARN (voir

Tableau 1) et un niveau d'expression pouvant varier dans certains tissus (Hanamura et al., 1998; Zahler et al., 1992). Ces observations suggèrent que, malgré la redondance de leurs fonctions au niveau de l'épissage constitutif, chacune des protéines de cette famille pourrait jouer un rôle différent dans la sélection d'un site d'épissage.

Tableau 1. Séquences ARN identifiées comme sites de liaison pour les protéines SR.

Protéine	Site de liaison	Méthode ¹	Référence
ASF/SF2	RGAAGAAC	SELEX	(Tacke et Manley, 1995)
	AGGACRRAGC		
	SRSASGA	Fonctionnelle	(Liu et al., 1998)
SC35	AGSAGAGUA	SELEX	(Tacke et Manley, 1995)
	GUUCGAGUA		
	UGUUCSAGWU		
	GWUWCCUGCUA		
	GGGUAUGCUG	SELEX	(Cavaloc et al., 1999)
	GAGCAGUAGKS		
	AGGAGAU		
	GRYYCSYR	Fonctionnelle	(Liu et al., 2000)
9G8	AGACKACGAY	SELEX	(Cavaloc et al., 1999)
	ACGAGAGAY		
SRp40	UGGGAGCRGUYRGCUCGY	SELEX	(Tacke et al., 1997)
	ACDGS	Fonctionnelle	(Liu et al., 1998)
SRp55	USCGKM	Fonctionnelle	(Liu et al., 1998)

N: tout nucléotide; R: purine; Y: pyrimidine; S: G ou C; K: U ou G; W: A ou U; D: A, G ou U; M: A ou C.

¹ "SELEX" indique que la séquence d'ARN est déterminée comme un site de haute affinité pour une protéine SR purifiée; "fonctionnelle" indique que la séquence d'ARN est déterminée pour son fonctionnement comme activateur d'épissage protéine SR-dépendant.

Les régions activatrices riches en ribonucléotides A/C ne sont pas reconnues par cette famille de protéines. Ces régions ont été retrouvées dans certains gènes ainsi que lors de criblages pour identifier des séquences potentiellement activatrices lorsque situées dans un exon (Coulter et al., 1997; Schaal et Maniatis, 1999b; van Oers et al., 1994; Wang et Manley, 1995). L'étude de la région exonique riche en A/C provenant de l'exon v4 du gène humain CD44 a permis d'identifier la protéine YB-1, une protéine

non-apparentée à la famille des protéines SR (Stickeler et al., 2001). Cette étude associe le rôle activateur d'une région située dans un exon à un facteur cellulaire autre qu'une protéine SR.

On peut aussi retrouver des régions activatrices dans les introns. Il y a au moins trois régions introniques importantes en aval de l'exon alternatif K-SAM du gène du récepteur 2 du facteur de croissance fibroblastique (*FGF-R2*) permettant l'inclusion de cet exon (Carstens et al., 1998; Del Gatto et Breathnach, 1995; Del Gatto et al., 1997). La région riche en uridines (appelé IAS1) située immédiatement en aval du site d'épissage 5' de l'exon K-SAM a été récemment associée à la liaison de la protéine TIA-1 *in vitro* et *in vivo* (Del Gatto-Konczak et al., 2000; Le Guiner et al., 2001) (Figure 4). On a retrouvé un autre site de liaison de TIA-1 en amont du site d'épissage 5' de l'exon 6 contenu dans le gène *FAS* (Forch et al., 2000). La liaison de TIA-1 est essentielle afin de permettre l'utilisation de ce site d'épissage 5'. En absence de TIA-1, l'inclusion de l'exon 6 est diminuée de trois fois dans le minigène de *FAS* et une surexpression de TIA-1 rétablit l'inclusion de l'exon 6 *in vivo* (Forch et al., 2000). La liaison de cette protéine à une région régulatrice stabilise la liaison du snRNP U1 au site d'épissage 5' favorisant ainsi son utilisation (Forch et al., 2000). Cette étude montre que la fonction de la protéine TIA-1 est comparable à celle de Nam8p, son homologue retrouvé chez *Saccharomyces cerevisiae* chez qui cette protéine permet la reconnaissance efficace d'un site d'épissage 5' normalement faiblement lié par le snRNP U1 (Puig et al., 1999).

On retrouve d'autres exemples d'éléments activateurs introniques qui permettent l'inclusion de l'exon neuro-spécifique N1 du gène *src*. Les protéines

hnRNP F et hnRNP H s'associent à la séquence régulatrice située en aval de l'exon N1 pour former un complexe activateur (Min et al., 1995; Chou et al., 1999) (Figure 4).

Un autre exemple se retrouve dans l'ARN précurseur du gène calcitonine/peptide du gène relié à calcitonine (CT/CGRP). Ce gène possède une région activatrice située en aval de l'exon 4 (Lou et Gagel, 1998; Lou et al., 1995). Lorsque la protéine PTB se lie à cette région de 127 nucléotides, l'inclusion de cet exon est augmentée et lorsque le niveau de PTB augmente *in vivo*, le niveau d'ARN messager possédant l'exon 4 augmente aussi (Lou et al., 1999). Malgré l'identification d'un nombre grandissant d'éléments activateurs et de facteurs associés, la façon dont ces éléments favorisent la sélection d'un site d'épissage reste à déterminer.

II- Éléments inhibiteurs

Certains éléments inhibiteurs agissent en formant une structure secondaire ARN-ARN avec les sites d'épissage empêchant la reconnaissance de ceux-ci (Blanchette et Chabot, 1997; Clouet d'Orval et al., 1991; Côté et Chabot, 1997; Estes et al., 1992; Hutton et al., 1998). D'autres éléments inhibiteurs requièrent la liaison de facteurs cellulaires.

La liaison de hnRNP H à un élément situé dans l'exon 7 du gène β -tropomyosine de rat empêche l'inclusion de cet exon dans l'ARN messager retrouvé dans les cellules non-musculaires (Chen et al., 1999). La protéine hnRNP H semble

aussi être associée à la répression d'un évènement d'épissage alternatif par le biais d'un élément intronique chez le virus du sarcome de Rous (Fogel et McNally, 2000).

La protéine PTB/hnRNP I représente un facteur cellulaire important impliqué dans l'inhibition de sites d'épissage. Plusieurs types de mécanismes sont utilisés par PTB pour affecter négativement l'épissage. Dans certains ARN pré-messagers, la région du site d'épissage 3' contient un site de liaison pour PTB. La présence de ces sites chevauchant le site de liaison pour U2AF cause une compétition pour la liaison respective de ces deux facteurs (Lin et Patton, 1995; Singh et al., 1995). Un des cas le mieux caractérisé pour ce type de compétition est la répression d'un exon de 24 nucléotides retrouvé dans l'ARN pré-messenger du gène du récepteur à acide gamma-aminobutyrique (GABA) (Ashiya et Grabowski, 1997; Zhang et al., 1996; Zhang et al., 1999). On retrouve 4 régions inhibitrices qui sont liées par PTB et qui agissent conjointement pour inhiber la reconnaissance de l'exon. Trois de ces sites se retrouvent près du site de branchement dont deux sont situés en amont du site de branchement et un est partie intégrante de la région riche en pyrimidines.

Dans d'autres circonstances, les sites de liaison de PTB ne chevauchent pas les sites de liaison pour U2AF (Chan et Black, 1995; Chan et Black, 1997; Chou et al., 1999; Gooding et al., 1994; Gooding et al., 1998; Perez et al., 1997; Southby et al., 1999). Dans ces cas, on retrouve des sites de liaison pour PTB de part et d'autre de l'exon dont l'inclusion est inhibée par PTB. Sachant que PTB peut multimériser, il a été proposé que les molécules de PTB liées peuvent interagir entre-elles. Des études *in vitro* ont montré que des mutations aux sites de liaison situés en amont affectaient la liaison de PTB aux sites situés en aval de l'exon et vice-versa (Chou et

al., 2000). Ce positionnement de part et d'autre de l'exon placerait celui-ci dans une région séquestrée créée par une interaction PTB-PTB à distance ou par une multimérisation.

D'autre part, la liaison de protéines SR à des séquences introniques a été associée à une activité inhibitrice de l'épissage. Par exemple, la liaison de protéines SR (comme ASF/SF2 et SRp30c) à un élément riche en purines retrouvé dans l'intron en amont de l'exon IIIa de l'unité d'épissage L1 d'adénovirus, inhibe l'épissage (Kanopka et al., 1996; Petersen-Mahrt et al., 1999). Dans ce cas, la liaison de la protéine SR interfère stériquement avec la liaison du snRNP U2 au site d'épissage 3' de l'exon IIIa. L'incapacité de former un complexe à ce site d'épissage 3' stimule l'utilisation du site d'épissage 3' de 52,55K situé en amont.

Par ailleurs, on retrouve quelques exemples de facteurs cellulaires affectant la sélection des sites d'épissage sans nécessairement affecter directement la reconnaissance de ces sites mais plutôt en affectant la fonction des protéines SR. Chez la drosophile, la protéine RSF1 est capable d'antagoniser la fonction des protéines SR. Des essais *in vitro* ont montré que l'ajout de RSF1 inhibe l'épissage de plusieurs ARN pré-messagers et que l'épissage peut être rétabli par l'ajout de protéines SR, dont ASF/SF2 et SC35 (Labourier et al., 1999b). *In vivo*, une surexpression de RSF1 peut enrayer le phénotype létal associé à la surexpression de SRp55/B52 (Labourier et al., 1999b). Puisque RSF1 lie des régions riches en purines, l'activité de RSF1 semble être associée à une compétition avec les protéines SR pour la liaison aux régions activatrices exoniques (Labourier et al., 1999a). Chez les mammifères, la protéine SRp86 est capable d'interagir et d'inhiber l'activation de

l'épissage *in vitro* et *in vivo* de certains membres de la famille des protéines SR dont ASF/SF2, SC35 et SRp55 (Barnard et Patton, 2000). L'activité des protéines SR peut aussi être enrayée par une autre protéine, hnRNP A1.

La protéine hnRNP A1

La protéine hnRNP A1 est probablement l'une des plus étudiées de la famille des hnRNPs. HnRNP A1 est impliquée dans le transport des ARN messagers (Izaurrealde et al., 1997; Michael et al., 1995), affecte la biogénèse des télomères (LaBranche et al., 1998) et module la sélection des sites d'épissage *in vivo* (Bai et al., 1999; Cáceres et al., 1994; Jiang et al., 1998; Yang et al., 1994) et *in vitro* (Mayeda et Krainer, 1992).

Plusieurs études ont montré l'importance de hnRNP A1 dans l'épissage alternatif. Premièrement, la protéine hnRNP A1 et ses homologues (i.e. hnRNP A2, B1, A1B) sont reconnus comme capables d'antagoniser l'activité des protéines SR. Lorsqu'on utilise un ARN pré-messager constitué de deux sites d'épissage 5' en compétition pour un seul site d'épissage 3', les protéines SR stimulent la sélection des partenaires les plus près tandis que hnRNP A1 favorise plutôt l'épissage des sites les plus éloignés (Mayeda et Krainer, 1992; Mayeda et al., 1994 et Figure 7). Cette fonction de hnRNP A1 sur la sélection des sites d'épissage 5' ne semble pas affecter la reconnaissance de ce site. Notre laboratoire a montré que la présence d'un site de haute affinité pour hnRNP A1 dans un ARN pré-messager favorise la sélection du site d'épissage 5' sans affecter la liaison du snRNP U1 aux sites d'épissage 5' en compétition (Chabot et al., 1997). Récemment, une autre étude a démontré que la

liaison de hnRNP A1 à un autre substrat pouvait affecter la liaison du snRNP U1 aux sites d'épissage 5' (Eperon et al., 2000). Deuxièmement, une variation dans la quantité de protéines hnRNP A1 affecte la sélection des sites d'épissage 5' *in vivo* (Cáceres et al., 1994; Yang et al., 1994). Troisièmement, les protéines hnRNP A1, A2 et B1 influencent négativement la sélection d'un site d'épissage 3' via une séquence exonique dans deux gènes du virus HIV (Bilodeau et al., 2001; Caputi et al., 1999).

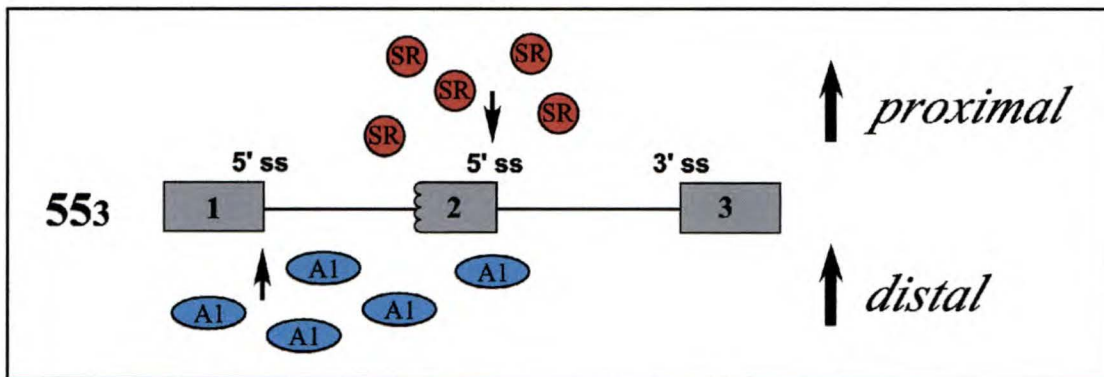


Figure 7. Effet antagoniste de hnRNP A1 et des protéines SR. Lorsqu'un ARN pré-messager possède deux sites d'épissage 5' (5'ss) en compétition pour le pairage avec un seul site d'épissage 3' (3'ss), l'ajout de protéine hnRNP A1 favorise l'utilisation du site d'épissage 5' le plus éloigné du site d'épissage 3' (site d'épissage 5' distal). L'ajout de protéines SR favorise l'utilisation du site d'épissage 5' le plus rapproché du site d'épissage 3' (site d'épissage 5' proximal). Les boîtes grises représentent les exons et les lignes représentent les introns.

Certains ARN pré-messagers possèdent des sites de haute affinité pour la protéine hnRNP A1. Le premier exemple de ce type est l'ARN pré-messager de hnRNP A1. Ce substrat contient quatre sites de liaison retrouvés dans les introns de part et d'autre de l'exon alternatif 7B (voir plus loin). On a aussi retrouvé des sites de haute affinité dans des éléments de régulation négatifs présents dans l'exon alternatif du gène *FGF-R2* (Del Gatto-Konczak et al., 1999), dans l'exon du gène *tat* (Caputi et

al., 1999), du gène *vpr* du virus HIV (Bilodeau et al., 2001) ainsi que dans l'exon V6 du gène CD44 humain (Konig et al., 1998; Matter et al., 2000).

HnRNP A1 est une protéine de 34 kDa constituée de deux domaines de liaison à l'ARN (appelés RRM), d'un signal de localisation nucléo-cytoplasmique de type M9 et d'une région C-terminale riche en glycines. Des essais de double hybride ont montré que la région riche en glycines a la capacité d'interagir avec un autre domaine riche en glycines (Cartegni et al., 1996). De plus, le domaine C-terminal est important pour le rôle de hnRNP A1 dans la modulation d'épissage alternatif. Lorsqu'on tronque cette région de la protéine pour former un mutant appelé UP1, la protéine est incapable de promouvoir l'utilisation des sites distants (Blanchette et Chabot, 1999; Mayeda et al., 1994). Ces observations ont permis de proposer un modèle où l'interaction entre des protéines hnRNP A1 modifie la structure de l'ARN pré-messager afin de favoriser l'utilisation des sites distants (Blanchette et Chabot, 1999).

L'ARN pré-messager de ce gène requiert un évènement d'épissage alternatif où l'exon 7B peut être inclus dans l'ARN messager spécifiant la protéine hnRNP A1B (36kDa). L'insertion de cet exon augmente la taille de la région riche en glycines. Jusqu'à présent, aucune différence de fonction n'a été retrouvée entre hnRNP A1 et A1B.

Comme l'ARN pré-messager de hnRNP A1 subit un évènement d'épissage alternatif et afin de mieux connaître le rôle joué par hnRNP A1 dans l'épissage alternatif, notre laboratoire a décidé d'étudier le rôle potentiel de hnRNP A1 dans son propre évènement d'épissage alternatif. La comparaison des séquences du gène de la

souris et celles du gène de l'homme a permis de mettre en évidence un très haut niveau de conservation dans les séquences introniques flanquant l'exon alternatif 7B (70% versus moins de 25% pour l'intron entre les exons 6 et 7). Il y a dix régions de conservation dont trois en amont et sept en aval de l'exon 7B. Étant donné ce haut niveau de conservation dans les régions non-codantes, nous avons émis l'hypothèse que ces régions introniques conservées peuvent jouer un rôle dans le contrôle de l'épissage alternatif de l'exon 7B. Jusqu'à présent, l'importance de quatre de ces régions dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 7B a été décrite (Figure 8).

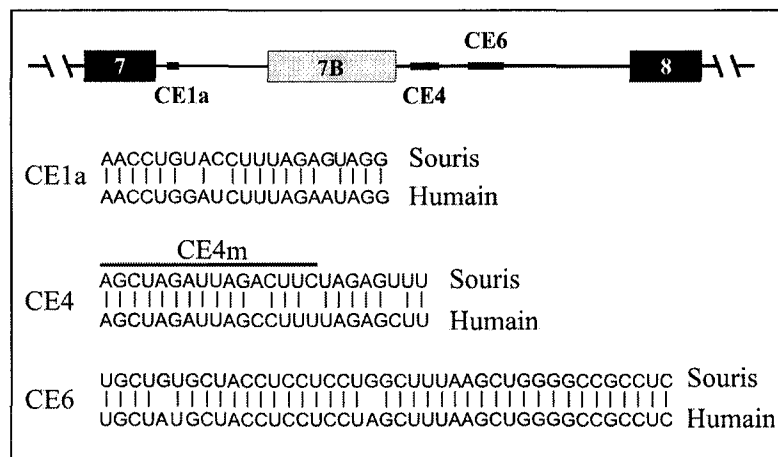


Figure 8. Représentation des éléments conservés dans les introns flanquant l'exon alternatif 7B de gène hnRNP A1. Les homologies de séquences entre la souris et l'homme sont montrées.

Un élément situé entre l'exon 7 et l'exon alternatif 7B (CE1a) lie de façon spécifique la protéine hnRNP A1 et influence la sélection du site d'épissage 5' de l'exon 7 au détriment du site d'épissage 5' de l'exon 7B *in vitro* et favorise l'exclusion de l'exon 7B *in vivo* (Chabot et al., 1997). Par la suite, on a découvert la présence

d'un second site de haute affinité pour hnRNP A1 en aval de l'exon 7B (CE4) qui est important pour la fonction de CE1a dans la sélection du site d'épissage 5' de l'exon 7 et pour promouvoir l'exclusion de l'exon 7B *in vivo* (Blanchette et Chabot, 1999). Ces études ont permis de suggérer un modèle de mécanisme utilisé par hnRNP A1 afin de promouvoir le pairage de sites d'épissage distants (Blanchette et Chabot, 1999). Un autre élément situé tout près de CE4, CE4m, pourrait aussi lier hnRNP A1. Cet élément affecte négativement l'utilisation du site d'épissage 3' de l'exon 7B et augmente l'exclusion de l'exon 7B *in vivo* (Blanchette et Chabot, 1999). La présence des éléments CE4 et CE4m, et la découverte récente d'un autre site de liaison pour hnRNP A1 près de CE1a, semble indiquer la présence de deux sites de liaison pour hnRNP A1 de chaque côté de l'exon alternatif 7B (Hutchison, 2001). En aval de l'exon 7B, on retrouve l'élément CE6 qui s'apparie avec le site d'épissage 5' de l'exon 7B pour former une structure ARN-ARN empêchant sa reconnaissance par le snRNP U1 et favorisant l'exclusion de l'exon 7B *in vivo* (Blanchette et Chabot, 1997).

Le but de mon étude de doctorat était de caractériser la fonction jouée par une autre région intronique hautement conservée, CE9, située en amont du site d'épissage 3' de l'exon 8. Notre laboratoire a démontré qu'au moins quatre régions introniques conservées dans l'ARN pré-messager de hnRNP A1 affectent la modulation de l'épissage alternatif de celui-ci. De plus, l'étude de ces régions ont permis de mettre en lumière de nouveaux mécanismes de régulation d'épissage alternatif. Donc la caractérisation de la région conservée CE9 s'avère importante afin de déterminer le rôle joué par ce nouvel élément intronique dans la modulation de l'épissage alternatif

de l'exon 7B. Puisque l'élément CE9 est situé à proximité du site d'épissage 3' de l'exon 8 (119 nt en amont de l'exon 8) et que la majorité des éléments introniques caractérisés jusqu'à présent affecte la sélection des sites d'épissage adjacents, on pourrait s'attendre à ce que CE9 influence l'inclusion de l'exon 7B en affectant la sélection du site d'épissage 3' de l'exon 8. De plus, la caractérisation de CE9 permettra de mieux comprendre la nécessité de contrôler, à l'aide de plusieurs éléments régulateurs distincts, l'inclusion ou l'exclusion d'un seul exon alternatif, phénomène qui se retrouve dans un nombre grandissant d'ARN pré-messagers chez les mammifères.

D'autre part, cette étude permettra d'améliorer la compréhension du rôle joué par les séquences introniques dans le choix fait par la machinerie d'épissage pour l'inclusion ou l'exclusion d'un exon alternatif. De plus, ce projet pourra mettre en évidence l'existence d'un nouveau facteur cellulaire impliqué dans l'épissage alternatif de hnRNP A1 et dans d'autres gènes épissés alternativement.

CHAPITRE I

M.J. Simard and B. Chabot. (2000) Control of hnRNP A1 alternative splicing: an intron element represses the use of the common 3' splice site. Molecular and Cellular Biology **20** (19): 7353-7362.

Préambule

Ce manuscrit décrit l'identification de l'élément CE9 positionné en amont du site d'épissage 3' de l'exon 8. Les résultats ont permis de montrer que CE9 réprime l'utilisation du site d'épissage 3' de l'exon 8 ainsi que d'autres sites d'épissage 3' *in vivo* et *in vitro*. Contrairement à la plupart des éléments négatifs, l'élément CE9 ne semble pas affecter la reconnaissance du site d'épissage 3'. Cette étude décrit pour la première fois un élément régulateur intronique qui affecte un site d'épissage 3' commun. J'ai réalisé toute les expériences dans cet article et j'ai contribué à son écriture.

L'article publié a été retiré de la thèse (pp. 25-34)

CHAPITRE II

M.J. Simard and B. Chabot. (2001) SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization.

Soumis à *Molecular and Cellular Biology*.

Preamble

Ce second manuscrit identifie SRp30c comme le facteur cellulaire liant l'élément CE9 et contribuant à son activité de répresseur de sites d'épissage 3'. De plus, nous montrons que cette activité est spécifique à SRp30c puisqu'une autre protéine SR, ASF/SF2, n'inhibe pas l'utilisation d'un site d'épissage 3'. J'ai réalisé toutes les expériences présentées dans ce travail et j'ai contribué à la rédaction.

SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization

Martin J. Simard and Benoit Chabot¹

Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4

RUNNING TITLE: SRp30c as a splicing repressor

¹Corresponding author. Mailing Address: Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 3001 12e avenue Nord, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4; Phone: (819) 564-5295. FAX (819) 564-5392. E-MAIL b.chabot@courrier.usherb.ca.

ABSTRACT

Several intron elements influence exon 7B skipping in the mammalian hnRNP A1 pre-mRNA. We have shown previously that the 38 nt-long CE9 element located in the intron separating alternative exon 7B from exon 8 can repress the use of a downstream 3' splice site. The ability of CE9 to act on heterologous substrates, combined with the results of competition and gel-shift assays, indicate that the activity of CE9 is mediated by a *trans*-acting factor. UV-crosslinking analysis revealed the specific association of a 25 kDa nuclear protein to CE9. Using RNA affinity chromatography, we isolated a 25 kDa protein that binds to CE9 RNA. This protein corresponds to SRp30c. Consistent with a role for SRp30c in the activity of CE9, recombinant SRp30c interacts specifically with CE9 and can promote splicing repression *in vitro* in a CE9-dependent manner. The closest homologue of SRp30c, ASF/SF2, does not bind to CE9 and does not repress splicing even when the intronic SRp30c binding sites are replaced for high-affinity ASF/SF2 binding sites. Only the first 7 nucleotides of CE9 are sufficient for binding to SRp30c and mutations that abolish binding also prevent repression. Our results suggest that SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization in the hnRNP A1 alternative splicing unit.

INTRODUCTION

The number of protein-coding genes in the human genome is only about 2 or 3 times the number found in a fruitfly, a worm or a plant. To reach the high levels of complexity that distinguishes mammals from lower organisms, alternative splicing is used to expand and diversify the repertoire of protein function. At least 60% of the human genes may be alternatively spliced (31). Since many genes have more than two, and some potentially up to several thousand alternatively spliced mRNA isoforms (reviewed in reference 23), the identity of the majority of human proteins may be determined by alternative splicing. Understanding the mechanism controlling the selection of splice sites in mammalian cells has therefore become a pressing challenge of contemporary post-genomic biology.

Several studies have uncovered sequence elements within pre-messenger RNAs that positively or negatively influence splice site utilization (reviewed in references 1, 5, 39). The interaction of cellular factors with these elements represents the most common way to modulate splice site utilization. Members of the family of SR proteins are one of the most important classes of cellular factors implicated in splice site selection (reviewed in reference (24). Recruitment of SR proteins on exonic splicing enhancers can increase U2AF⁶⁵ or U2 snRNP binding to an upstream 3' splice site (32, 36, 55, 61). Positioning SR binding sites near a 5' splice site may also facilitate the stable recruitment of U1 snRNP (4, 14, 16, 17, 29, 34, 51).

A variety of elements repressing splice site utilization have also been reported. Some elements act by forming duplex structures that impair splice site recognition (2, 11, 13, 30). Other silencer elements require the contribution of *trans*-acting factors. The polypyrimidine tract binding protein (PTB) has often been associated with the activity of

silencer elements (reviewed in references (58, 60). PTB binding sites can overlap with those of U2AF⁶⁵, leading to competition for binding to the 3' splice site region (37, 53). This type of repression is similar to the mechanism used by the *Drosophila* female-specific splicing factor SXL to prevent U2AF⁶⁵ binding to the tra pre-mRNA, leading to the selection of a weaker downstream 3' splice site (22, 59). In other cases, PTB and SXL binding sites do not directly overlap with splice sites regions (8-10, 20, 21, 27, 28, 46, 54). The mechanism of repression in these cases remains unclear.

Factors that have been initially identified as repressor or activator in one system can display an opposite behavior in different pre-mRNAs. This is the case for PTB which has been reported as promoting splice site recognition in gene coding for calcitonin and calcitonin gene-related peptide (40). Likewise, the binding of SR proteins to intron sequences can have a negative impact on splicing. For example, the binding of SR proteins to a purine-rich element located in the intron upstream of the IIIa exon of adenovirus L1 splicing unit inhibits splicing (33, 47). In this case, SR protein binding is thought to sterically interfere with the interaction of U2 snRNP with the 3' splice site region of exon IIIa. SR proteins have also been found in association with repressor elements in the Rous sarcoma virus (RSV) pre-mRNA (42), and the cystic fibrosis transmembrane regulator gene (45). In myotonic dystrophy, an increasing expression of the CUG-BP protein in skeletal muscle tissue can affect alternative splicing of two different pre-mRNAs in a opposite manner. The overexpression of CUG-BP can either promote aberrant inclusion of exon 5 from human cardiac troponin T pre-mRNA (48) or repress inclusion of exon 11 from insulin receptor pre-mRNA (49).

To study the control of alternative splicing, we have used the hnRNP A1 gene as a model system. Exclusion and inclusion of exon 7B in the hnRNP A1 pre-mRNA generate two different messenger RNAs encoding the A1 and A1B proteins, respectively. We have previously identified elements capable of influencing the alternative splicing of exon 7B: CE6 base-pairs with the 5' splice site region of exon 7B to decrease its use (2), CE4m represses the 3' splice site of exon 7B (3), and hnRNP A1 binding sites located on both sides of exon 7B promote exon skipping (3, 7). Our previous work on an 38-nt intron element called CE9 has uncovered an activity that can repress splicing to a downstream 3' splice site (52). In the current study, we identify a member of the family of SR proteins, SRp30c, as the factor that binds to CE9, and we provide evidence to support a direct role of SRp30c in the repressing activity of CE9.

MATERIAL AND METHODS

Plasmid constructs

To generate pC3'-/2x, the *HincII*-*EcoRV* fragment of pK9-2x (described in 52) was inserted into the *EcoRV* site of plasmid pC3'-/- which is described by Blanchette and Chabot (3). To produce pKCE9 and derivatives, pBluescript II KS(+) was cut with *HincII*, and reannealed oligonucleotides were inserted at this site. To generate pK9.7-2x, pK9.7-3x and mutants, oligonucleotides were successively inserted in pBluescript II KS(+) as described by Simard and Chabot (50). To generate pA3xPu, reannealed oligonucleotides 3 x Pu (GGGAGGACAAGCTGGGGAGGACAAGCTGGGGAGGACAGCTG) and its complementary sequence were inserted at the *StuI* site of pSPAdStu (36). These

reannealed oligonucleotides 3xPu were also inserted at the *HincII* site of pBluescript II KS(+) to produce pK3xPu. Plasmids pA3xCE9.7 and mutants were produced by insertion of a *HincII* and *EcoRV* fragment, taken from pK9.7-3x and derivatives, into pSPAdStu previously digested with *StuI*. All the other constructs are described by Simard and Chabot (50). All constructs were verified by extensive restriction enzyme analysis and DNA sequencing when appropriate.

***In vitro* transcription**

Pre-mRNAs substrates A, A3xPu, A2x and A3x and derivatives were produced from plasmids linearized with *HincII* and transcribed with SP6 RNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech) in the presence of cap analog and [α -³²P] UTP (Amersham Pharmacia Biotech). The C3'-/2x transcript was obtained after linearization of the plasmid by *ScaI* and transcription with T3 RNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech). CE9, CE9.17 and CE9.12d RNAs and K+ RNA were produced from plasmids linearized with *ClaI* and transcribed with T3 RNA polymerase. CE9.8d, CE9.7, mutated versions and 3xPu RNAs were obtained from plasmids linearized with *EcoRI* and transcribed with T3 RNA polymerase. Cold RNA was produced as above except that the relative amount of [α -³²P] UTP was reduced 2000-fold. The purification of all RNA molecules was performed as described by Chabot (6).

***In vitro* splicing assays**

HeLa nuclear extracts were prepared (15) and used in splicing reactions as previously described (7). Identification of lariat molecules and other splicing products was

confirmed by performing a debranching reactions in a S100 extract followed by migration relative to molecular weight standards. Competition with cold RNA was performed by pre-incubating the splicing mixture with the competitor RNA for 10 min at 30°C prior to the addition of the radiolabeled pre-mRNA substrate.

UV cross-linking

Radiolabeled RNA were incubated for 10 minutes under standard splicing condition. One half of the reaction was irradiated for 10 minutes with UV and digested with RNase A as described by Côté *et al* (12). The cross-linking assay performed in the presence of heparin was performed in the buffer used for mobility-shift assays (see below). After incubation, one half of the reaction was irradiated for 10 minutes with UV and digested with RNase A. Cross-linking products were analyzed by electrophoresis on 12.5% SDS-polyacrylamide gels.

Gel-shift assays

RNA mobility-shift assays were performed by incubating RNAs for 15 minutes on ice in splicing conditions prior to the addition of 1 mg/ml of heparin and incubation for 2 min on ice. The reactions were run on a 5% native acrylamide gel (29:1 acrylamide:bis-acrylamide, 5% glycerol, 50 mM Tris pH 8.8, 50 mM glycine) in Tris-glycine running buffer (50 mM Tris pH 8.8, 50 mM glycine).

RNA Affinity chromatography

Fifty nanomoles of synthetic RNA oligonucleotide corresponding to CE9 (CUGGAUUAUUCAACUG) or an adenovirus RNA (C RNA, AAUGUCUGCUACUGG) (Dharmacon Research Inc.) were incubated 1 h on ice, protected from light, in a 100 µl reaction volume containing 100 mM Tris-HCl pH 7.5 and 10 mM sodium periodate. The periodate-treated RNAs were coupled to 0.5 ml of agarose adipic acid hydrazide resin following the manufacturer's protocol (Amersham Pharmacia Biotech). The resin was washed twice with 10 ml of storage buffer (20 mM Hepes-KOH pH 7.9, 100 mM KCl, 20% glycerol, 5.7 mM MgCl₂, 1 mM DTT) and kept as a 50% slurry at 4°C. The coupling efficiency, which was typically higher than 95%, was measured by comparing the absorbance at 260 nm of 1% of the input periodate-treated RNA to 10% of the unbound material. 175 µl of HeLa nuclear extract containing 5.7 mM MgCl₂, 0.90 mM ATP, 36 mM phosphocreatine, 3.58 mM DTT and 1.25 unit/ml RNAGuard were incubated with 50 µl of packed beads for 10 min at 30 °C under agitation. The mixture was spun and the supernatant was transferred to a second tube containing 50 µl of the same packed beads. The beads were washed 4 times with 1 ml of 70% buffer D (20 mM Hepes-KOH pH 7.9, 100 mM KCl, 20% glycerol, 1 mM DTT) containing 5.7 mM MgCl₂. The bound proteins were pooled and loaded on gel after boiling the beads in 100 µl of loading dye (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 6 M urea, 10% glycerol, 2% SDS, 0.7 M mercaptoethanol, 0.003 % bromophenol blue).

Recombinant protein purification

Recombinant GST-ASF/SF2, GST-SRp30c were purified using glutathione-Sepharose column (Amersham Pharmacia Biotech), as described by the manufacturer in Rec buffer (20 mM piperazine-HCl pH 9.5, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM bacitracine, 20 µg/ml benzamidine, 0.5 mM PMSF) in the presence of 3 mg/ml lysozyme and 1% Triton-X100. The columns were washed with Rec buffer containing 0.1% Triton-X100 and eluted in elution buffer (200 mM piperazine-HCl pH 9.5, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, 20 mM reduced glutathione. Trx(thioredoxin-His)-SRp30c was purified by standard Ni-column chromatography as described by Lamontagne *et al* (35). The purified proteins were extensively dialyzed against buffer D (20 mM Hepes pH 7.9, 100 mM KCl, 20% glycerol, 0.5 mM DTT). The concentration of recombinant proteins was measured by Bradford (BioRad) and/or estimated by Coomassie Blue stained SDS-polyacrylamide gels using serial dilutions of bovine serum albumin (BSA) as standard.

RESULTS

Repression of a downstream 3' splice site by CE9 requires a trans-acting factor in vitro

We have shown previously that the CE9 element (38 nt) can repress 3' splice site usage (52). When we use a model hnRNP A1 pre-mRNA carrying a single 5' splice site and two 3' splice sites, the insertion of 2 copies of CE9 in between the competing 3' splice sites leads to an almost exclusive use of the proximal 3' splice site (Fig. 1C, lane 1). In contrast, the insertion of unrelated sequences of the same length yields predominant splicing to the distal 3' splice site (Fig. 1C, lane 2). In a one-intron splicing unit, 3 copies of CE9 strongly inhibit splicing (Fig. 1C, compare lane 3 and lane 4). This inhibition of

splicing suggests that the 3' splice site located downstream of CE9 was repressed in the model pre-mRNA carrying competing 3' splice sites.

The splicing activity of the one-intron pre-mRNA containing three copies of CE9 (A3x RNA) was restored when an excess of a cold competitor RNA containing 3 copies of CE9 sequence (3x9f) was pre-incubated in a HeLa extract (Fig. 1D, lanes 2 to 4). This competitor RNA did not affect the splicing efficiency of a control pre-mRNA lacking CE9 (lanes 6 to 8). This result is consistent with our previous demonstration that an excess of CE9 RNA can inhibit splicing to the proximal site in a model pre-mRNA carrying competing 3' splice sites (52). These results suggest that a cellular factor interacts with the CE9 element to mediate its effect.

CE9 is bound by a nuclear factor of 25 kDa

To detect the interaction of factors with CE9 in a HeLa nuclear extract, we performed a gel-shift assay. ³²P-labeled RNA probes were incubated in the extract and complexes were resolved on a non-denaturing gel. An RNA containing the complete 38 nt of CE9 formed a complex in a HeLa extract (Fig. 2B, lane 4). In contrast, a control RNA carrying only plasmid sequences did not form a complex (lane 2). Complex formation occurred in a nuclear extract depleted of ATP and kept at 0°C (data not shown). A smaller RNA carrying the first 17 nt (CE9.17) was also assembled into a low-mobility complex (lane 6). Although the last 12 nt of CE9 (CE9.12d) elicited complex formation, the majority of the RNA remained free (lane 8), suggesting that the interaction of cellular factors with the 3' end of CE9 is considerably weaker. These results indicate that the HeLa nuclear extract contains one or several factors that can specifically associate with CE9.

To address the identity of the cellular factors that interact with CE9, we first performed a UV cross-linking assay. Following incubation in a nuclear extract, ³²P-labeled RNA probes were digested with RNase A and the proteins were resolved by SDS-PAGE. Comparing the cross-linking patterns of a control RNA with the pattern of CE9 RNA revealed specific bands migrating at 25, 46 and 65 kDa (Fig. 2C, compare lanes 1 and 2). When the cross-linking of CE9 RNA was performed under gel-shift conditions (i.e., in the presence of heparin as competitor), only the 25 kDa band remained visible (Fig. 2C, compare lanes 3 and 4). Moreover, the utilization of cold CE9 RNA as competitor specifically prevented the appearance of this band (data not shown). These results suggest that CE9 is bound specifically by a 25 kDa protein.

A CE9 RNA column retains a 25 kDa nuclear protein: SRp30c

To address the identity of the 25 kDa protein, we performed RNA affinity chromatography using the first 16 nt of CE9 covalently linked to an adipic acid hydrazide column (Fig. 3A). After loading the RNA column with a HeLa nuclear extract under splicing conditions, beads were washed. Bound proteins were fractionated onto SDS-polyacrylamide gel and stained with AgNO₃. Comparing the profile of proteins retained by a control RNA column and the CE9 RNA column revealed a protein of approximately 25 kDa that was specifically retained by the CE9 RNA (Fig. 3B, compare lanes 1 and 2).

For the purpose of identification, the band was excised and sent for mass spectroscopy analysis (MALDI-MS) to the W.M. Keck Facility (Yale University, USA). The tryptic digestion of the 25 kDa protein generated 21 peptides. A search in ProFound database using the masses of those peptides, indicated that 9 out of the 21 peptides

covered 32% the sequence of the human splicing factor arginine/serine-rich 9 protein, also known as SRp30c. No additional protein were identified by a second ProFound search with unmatched peptides masses. These results were confirmed by another search in the Pepsea database. These results indicate that the 25 kDa protein that specifically binds to the CE9 RNA corresponds to SRp30c, a member of the family of SR proteins.

Recombinant SRp30c binds specifically to CE9

To confirm that SRp30c can interact specifically with CE9, we used GST-tagged SRp30c (rSRp30c, kindly provided by Stefan Stamm, Erlangen, Germany) in a mobility shift assay. ³²P-labeled CE9 RNA was incubated in the presence of increasing amounts of GST-SRp30c. Complex formation occurred with CE9 RNA but not with a control RNA (Fig. 4, compare lanes 2 to 5 with lanes 11 to 14). The specificity of the interaction of SRp30c with CE9 was also assessed by testing the binding of ASF/SF2, a protein that displays 74% amino acid identity with SRp30c. The RS domain of SRp30c is the shortest of all SR protein reported to date, an attribute that may explain why SRp30c is not as active as ASF/SF2 in its ability to confer splicing activity to a HeLa S100 extract (50). Recombinant ASF/SF2 did not form a complex with CE9 RNA (Fig. 4, lanes 6 to 9). Thus, despite the high degree of similarity between ASF/SF2 and SRp30c, only the latter can bind to CE9.

SRp30c is required to elicit repression by CE9

To further examine the implication of SRp30c in the activity of CE9, we carried out an *in vitro* splicing reaction with the one-intron model pre-mRNA used previously. In this

splicing system, 3 copies of CE9 inhibit splicing (Fig. 5, lane 1) and splicing activity is restored by pre-incubation with an excess of CE9 RNA (3x9f) (Fig. 5, lane 2). When a Trx-tagged SRp30c (kindly provided by Göran Akusjärvi, Uppsala, Sweden) was added to a mixture containing an excess of CE9 RNA, inhibition was restored (Fig. 5, lanes 3-4). In contrast, a pre-mRNA lacking CE9 was not affected by the addition of cold CE9 (Fig. 5, lane 7), and the addition of SRp30c only promoted a small reduction in splicing at the highest concentration (Fig. 5, lane 9). The effect was specific for SRp30c since the addition of recombinant ASF/SF2 was not inhibitory (Fig. 5, lanes 5 and 10).

The experiment presented above does not rule out the possibility that a CE9-bound repressor distinct from SRp30c might be displaced by an excess of SRp30c. To rule out this possibility, we used a one-intron pre-mRNA containing two copies of CE9 (A2x). The presence of two copies of CE9 is not sufficient to inhibit splicing (Fig. 6, compare lane 1 and 6). In this context, the addition of rSRp30c represses splicing in a CE9-dependent manner (Fig. 6, compare lanes 2-3 with lanes 7-8). Notably, no inhibition was observed with ASF/SF2 (lanes 4-5 and lanes 9-10). These results suggest that SRp30c plays a direct role in the repression mediated by CE9.

The first 7 nucleotides of CE9 are important for SRp30c binding

We used the first 16 nt of CE9 to recover SRp30c by affinity chromatography. To further narrow down the sequence requirement for binding by SRp30c, we performed a gel-shift assay with smaller RNA fragments. rSRp30c could bind specifically to the first 7 nucleotides of CE9 but not to the immediately downstream 8 nt portion (Fig. 7B, compare lanes 6 to 8 with lanes 2 to 4, respectively). To probe the sequence requirement

in this 7 nt portion, mutated versions of CE9.7 were tested in a mobility shift assay. Swapping the G at position 4 for the A at position 5 (CE9.7AG) or converting the G at position 3 into an A (CE9.7A3) abolished SRp30c binding (Fig. 7B, see lanes 9 to 16).

Mutations that eliminated the binding of SRp30c also abrogated the CE9-dependent repressing activity. We used an adenovirus pre-mRNA containing in its intron three copies of the first 7 nucleotides of CE9. As expected, this pre-mRNA is poorly spliced *in vitro* (Fig. 7C, lane 1). Splicing was more efficient when tandem copies of the mutated version of CE9 were inserted (Fig. 7C, lanes 2 and 3). Likewise, inserting two copies of the minimal version (7 nt) of CE9 in the pre-mRNA carrying competing 3' splice sites led to an increase (from 0 to 17%) in the use of the proximal 3' splice site (Fig. 7C, lane 5). In contrast, the mutated versions were less active at promoting proximal 3' splice site usage (lanes 6-7). These results suggest that the binding of SRp30c to CE9 is important for the repression of splicing.

The repressing activity of SRp30c is not a general property of SR proteins bound to intron sequences

To address whether the binding of another SR protein in the intron can also promote repression, we substituted the 3 copies of CE9.7 with 3 copies of a purine-rich element that represents a high-affinity binding site for ASF/SF2 (38). A gel-shift assay performed with the purine-rich element and the CE9.7 RNA reveals that recombinant ASF/SF2 binds to the purine-rich element (Fig. 8B, lanes 2 to 5). Notably, rSRp30c could bind to the purine-rich element at least as efficiently as to CE9.7 (Fig. 8B, lanes 6 to 9 and 11 to 14). The insertion of this purine rich-element at the same position than CE9 in the intron

of an adenovirus pre-mRNA did not compromise splicing activity (Fig. 8C, compare lane 2 and 3). Thus, the presence in an intron of high-affinity binding sites for ASF/SF2 did not elicit splicing inhibition. Although this element is also bound by SRp30c, its binding by the higher abundance ASF/SF2 protein (25) probably explains the lack of repressing activity in a HeLa extract. Thus, targeting the binding of a different yet closely related SR protein in the intron does not promote splicing repression.

DISCUSSION

In a previous study we reported the identification of CE9, an intron element that can repress the 3' splice site of exon 8 in the hnRNP A1 pre-mRNA (52). The capacity of CE9 to act on heterologous substrates combined with the loss of repression obtained while using a molar excess of a CE9 RNA implicated a cellular factor in the repressing activity of CE9. Here we show that a 25 kDa protein specifically cross-links to the CE9 RNA element. We have isolated a 25 kD protein by RNA affinity chromatography, and identified it as SRp30c. *In vitro* assays support the implication of SRp30c in the activity of CE9. First, recombinant SRp30c specifically interacts with CE9 in gel mobility shift assays. Second, the addition of recombinant SRp30c to a HeLa nuclear extract specifically represses the splicing of pre-mRNAs containing CE9. Third, mutations in CE9 that abolish the binding of SRp30c also abrogate splicing inhibition. Collectively, these results indicate that SRp30c mediates the repressing activity of CE9. We have not ruled out the possibility that other factors collaborate with SRp30c to silence a downstream 3' splice site. Other proteins may interact with the conserved portion of CE9 that is not bound by SRp30c. It also will be worthwhile to test whether proteins that can

interact with SRp30c in a yeast two-hybrid assay (43, 56, 57, 62) can potentiate the activity of CE9.

The contribution of SR proteins to splicing has been associated principally with activation, either as generic splicing factors or as proteins that bind to exon enhancer elements to stimulate the use of an adjacent splice site (24). However, there exists a few cases of splicing repression implicating the SR proteins. The binding of an SR protein to the Rous sarcoma virus (RSV) intron silencer element may be important to elicit repression but is not sufficient by itself (41, 42). As is the case with CE9, the RSV intron silencer does not affect U2 snRNP-dependent complex formation (19). It was proposed that the binding of SR proteins enhances U1 snRNP binding to another region of the RSV silencer, leading to the formation of a non-productive spliceosome (26, 41, 44). Whether a similar mechanism is taking place with CE9 remains to be demonstrated.

The activity of CE9 is also reminiscent of the activity of the intron silencer element 3RE found in the adenovirus IIIa pre-mRNA (33, 47). Although recombinant SRp30c can also bind to 3RE to repress splicing, the natural contribution of SRp30c to splicing inhibition in this case remains unclear because the more abundant ASF/SF2 protein can also bind to 3RE and elicit repression (33, 47). In contrast, we have shown that ASF/SF2 does not strongly bind to CE9 and does not promote splicing repression of a CE9-containing pre-mRNA. CE9 does not appear to be functionally equivalent to 3RE. First, 3RE but not CE9 can function as an enhancer when placed downstream from a 3'splice site site ((33) and data not shown). Second, the proximity of 3RE to the branch site is apparently responsible for the interference with U2 snRNP binding to the branch site (33). In contrast, the assembly of U2-dependent complexes is not compromised by

CE9 (52). CE9 is naturally located 100 nt upstream from the putative branch site of exon 8 and we have observed a similar level of inhibition when CE9 is positioned up to 300 nt from the adenovirus branch site (data not shown). Based on these considerations we conclude that the activity of 3RE and CE9 is likely mediated by different factors which use different mechanisms of splicing inhibition.

Finally, it is worth noting that the presence of binding sites for SR proteins in introns is not always associated with splicing inhibition. In the case of the tropomyosin, natural binding sites for SR proteins have been associated with enhancer activity (18). We have also shown previously that positioning the exonic splicing enhancer from human fibronectin ED1 exon in the intron does not inhibit splicing (36). Finally, we have shown here that inserting several copies of a purine-rich element bound by ASF/SF2 at the same position as CE9 does not promote splicing repression.

These and previous observations suggest that CE9 plays a role the control of hnRNP A1 alternative splicing. We have identified several elements that prevent efficient exon 7B inclusion in the hnRNP A1 pre-mRNA (3, 7). Among these, CE6 impairs the use of the 5' splice site of exon 7B by forming a stable duplex structure with this splice site (2). Duplex formation essentially converts the hnRNP A1 alternative splicing unit into a situation where the 3' splice sites of exon 7B and exon 8 are in competition for pairing with the 5' splice site of exon 7. By repressing the 3' splice site of exon 8, CE9 should therefore favor the production of the A1B mRNA which contains exon 7B. While CE9 has an impact on exon skipping *in vivo* using an heterologous system, the expression of a mini-gene carrying a deletion of CE9 does not significantly affect the frequency of exon 7B inclusion (52). In contrast, the addition of several copies of CE9 in the A1 mini-gene

completely abrogates splicing to the 3' splice site of exon 8 (52). The impact of a single CE9 element can be difficult to observe because CE9 may be too weak to offset the activity of the other elements that favor exon 7B skipping. The contribution of CE9 to splicing control may become more important when the concentration of SRp30c is higher. Notably, while RT-PCR was required to detect the SRp30c mRNA in HeLa cells, the abundance of this transcript varies in a tissue-specific manner (50). We are currently assessing whether variations in the abundance of SRp30c in different cells are associated with differences in the inclusion of exon 7B, and are testing the effect of overexpressing SRp30c on the production of the A1 and A1B proteins.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Stefan Stamm for GST-ASF/SF2 and GST-SRp30c plasmids and Göran Akusjärvi for providing the Trx-SRp30c plasmid. We thank Bruno Lamontagne for help with the purification of Trx-SRp30c. We thank Aline Simoneau and Annie Leroux for preparing nuclear extracts, and Serge Gravel and members of the laboratory for comments on the manuscript. M.J.S. was the recipient of a studentship from the FCAR/FRSQ. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to B.C. B.C. is a Canada Research Chair in Functional Genomic, and is a member of the Sherbrooke RNA/RNP group supported by the Université de Sherbrooke, the FCAR and the CIHR (grant number MGC-48372).

REFERENCES

1. **Black, D. L.** 1995. Finding splice sites within a wilderness of RNA. *RNA*. **1**:763-771.
2. **Blanchette, M., and B. Chabot** 1997. A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B. *RNA*. **3**:405-419.
3. **Blanchette, M., and B. Chabot** 1999. Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *EMBO J*. **18**:1939-1952.
4. **Bourgeois, C. F., M. Popielarz, G. Hildwein, and J. Stevenin** 1999. Identification of a bidirectional splicing enhancer: differential involvement of SR proteins in 5' or 3' splice site activation. *Mol Cell Biol*. **19**:7347-7356.
5. **Chabot, B.** 1996. Directing alternative splicing: cast and scenarios. *Trends Genet*. **12**:472-478.
6. **Chabot, B.** 1994. Synthesis and purification of RNA substrates., p. 1-29. *In* D. Hames, and S. Higgins (eds), *RNA processing*, vol. 1. Oxford University Press, Oxford.
7. **Chabot, B., M. Blanchette, I. Lapierre, and H. La Branche** 1997. An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Mol Cell Biol*. **17**:1776-1786.
8. **Chan, R. C., and D. L. Black** 1995. Conserved intron elements repress splicing of a neuron-specific c-src exon in vitro [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1997 May;17(5):2970]. *Mol Cell Biol*. **15**:6377-6385.
9. **Chan, R. C., and D. L. Black** 1997. The polypyrimidine tract binding protein binds upstream of neural cell- specific c-src exon N1 to repress the splicing of the intron downstream. *Mol Cell Biol*. **17**:4667-4676.

10. **Chou, M. Y., J. G. Underwood, J. Nikolic, M. H. Luu, and D. L. Black** 2000. Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing. *Mol Cell*. **5**:949-957.
11. **Clouet d'Orval, B., Y. d'Aubenton Carafa, P. Sirand-Pugnet, M. Gallego, E. Brody, and J. Marie** 1991. RNA secondary structure repression of a muscle-specific exon in HeLa cell nuclear extracts. *Science*. **252**:1823-1828.
12. **Côté, J., J. Beaudoin, R. Tacke, and B. Chabot** 1995. The U1 small nuclear ribonucleoprotein/5' splice site interaction affects U2AF65 binding to the downstream 3' splice site. *J Biol Chem*. **270**:4031-4036.
13. **Côté, J., and B. Chabot** 1997. Natural base-pairing interactions between 5' splice site and branch site sequences affect mammalian 5' splice site selection. *RNA*. **3**:1248-1261.
14. **Côté, J., M. J. Simard, and B. Chabot** 1999. An element in the 5' common exon of the NCAM alternative splicing unit interacts with SR proteins and modulates 5' splice site selection. *Nucleic Acids Res*. **27**:2529-2537.
15. **Dignam, J. D., R. M. Lebovitz, and R. G. Roeder** 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*. **11**:1475-1489.
16. **Elrick, L. L., M. B. Humphrey, T. A. Cooper, and S. M. Berget** 1998. A short sequence within two purine-rich enhancers determines 5' splice site specificity. *Mol Cell Biol*. **18**:343-352.

17. **Eperon, I. C., D. C. Ireland, R. A. Smith, A. Mayeda, and A. R. Krainer** 1993. Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF. *EMBO J.* **12**:3607-3617.
18. **Gallego, M. E., R. Gattoni, J. Stevenin, J. Marie, and A. Expert-Bezancon** 1997. The SR splicing factors ASF/SF2 and SC35 have antagonistic effects on intronic enhancer-dependent splicing of the beta-tropomyosin alternative exon 6A. *EMBO J.* **16**:1772-1784.
19. **Gontarek, R. R., M. T. McNally, and K. Beemon** 1993. Mutation of an RSV intronic element abolishes both U11/U12 snRNP binding and negative regulation of splicing. *Genes Dev.* **7**:1926-1936.
20. **Gooding, C., G. C. Roberts, G. Moreau, B. Nadal-Ginard, and C. W. Smith** 1994. Smooth muscle-specific switching of alpha-tropomyosin mutually exclusive exon selection by specific inhibition of the strong default exon. *EMBO J.* **13**:3861-3872.
21. **Gooding, C., G. C. Roberts, and C. W. Smith** 1998. Role of an inhibitory pyrimidine element and polypyrimidine tract binding protein in repression of a regulated alpha-tropomyosin exon. *RNA.* **4**:85-100.
22. **Granadino, B., L. O. F. Penalva, M. R. Green, J. Valcárcel, and L. Sanchez** 1997. Distinct mechanisms of splicing regulation in vivo by the *Drosophila* protein Sex-lethal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:7343-7348.
23. **Graveley, B. R.** 2001. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* **17**:100-107.

24. **Graveley, B. R.** 2000. Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*. **6**:1197-1211.
25. **Hanamura, A., J. F. Caceres, A. Mayeda, B. R. Franza, Jr., and A. R. Krainer** 1998. Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *RNA*. **4**:430-444.
26. **Hibbert, C. S., R. R. Gontarek, and K. L. Beemon** 1999. The role of overlapping U1 and U11 5' splice site sequences in a negative regulator of splicing. *RNA*. **5**:333-343.
27. **Horabin, J. I., and P. Schedl** 1993. Regulated splicing of the *Drosophila* sex-lethal male exon involves a blockage mechanism. *Mol Cell Biol*. **13**:1408-1414.
28. **Horabin, J. I., and P. Schedl** 1993. Sex-lethal autoregulation requires multiple cis-acting elements upstream and downstream of the male exon and appears to depend largely on controlling the use of the male exon 5' splice site. *Mol Cell Biol*. **13**:7734-7746.
29. **Humphrey, M. B., J. Bryan, T. A. Cooper, and S. M. Berget** 1995. A 32-nucleotide exon-splicing enhancer regulates usage of competing 5' splice sites in a differential internal exon. *Mol Cell Biol*. **15**:3979-3988.
30. **Hutton, M., C. L. Lendon, P. Rizzu, M. Baker, S. Froelich, H. Houlden, S. Pickering-Brown, S. Chakraverty, A. Isaacs, A. Grover, J. Hackett, J. Adamson, S. Lincoln, D. Dickson, P. Davies, R. C. Petersen, M. Stevens, E. de Graaff, E. Wauters, J. van Baren, M. Hillebrand, M. Joosse, J. M. Kwon, P. Nowotny, P. Heutink, and et al.** 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*. **393**:702-705.

31. **International Human Genome Sequencing Consortium** 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. **409**:860-921.
32. **Kan, J. L., and M. R. Green** 1999. Pre-mRNA splicing of IgM exons M1 and M2 is directed by a juxtaposed splicing enhancer and inhibitor. *Genes Dev.* **13**:462-471.
33. **Kanopka, A., O. Mühlemann, and G. Aküsjarvi** 1996. Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre- mRNA. *Nature*. **381**:535-538.
34. **Kohtz, J. D., S. F. Jamison, C. L. Will, P. Zuo, R. Lührmann, M. A. Garcia-Blanco, and J. L. Manley** 1994. Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature*. **368**:119-124.
35. **Lamontagne, B., A. Tremblay, and S. Abou Elela** 2000. The N-terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Mol Cell Biol.* **20**:1104-1115.
36. **Lavigne, A., H. La Branche, A. R. Kornblihtt, and B. Chabot** 1993. A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding. *Genes Dev.* **7**:2405-2417.
37. **Lin, C. H., and J. G. Patton** 1995. Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors. *RNA*. **1**:234-245.
38. **Liu, H. X., M. Zhang, and A. R. Krainer** 1998. Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev.* **12**:1998-2012.
39. **Lopez, A. J.** 1998. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet.* **32**:279-305.

40. **Lou, H., D. M. Helfman, R. F. Gagel, and S. M. Berget** 1999. Polypyrimidine tract-binding protein positively regulates inclusion of an alternative 3'-terminal exon. *Mol Cell Biol.* **19**:78-85.
41. **McNally, L. M., and M. T. McNally** 1998. An RNA splicing enhancer-like sequence is a component of a splicing inhibitor element from Rous sarcoma virus. *Mol Cell Biol.* **18**:3103-3111.
42. **McNally, L. M., and M. T. McNally** 1996. SR protein splicing factors interact with the Rous sarcoma virus negative regulator of splicing element. *J Virol.* **70**:1163-1172.
43. **Nayler, O., W. Stratling, J. P. Bourquin, I. Stagljar, L. Lindemann, H. Jasper, A. M. Hartmann, F. O. Fackelmayer, A. Ullrich, and S. Stamm** 1998. SAF-B protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements. *Nucleic Acids Res.* **26**:3542-3549.
44. **Paca, R. E., C. S. Hibbert, C. T. O'Sullivan, and K. L. Beemon** 2001. Retroviral splicing suppressor requires three nonconsensus uridines in a 5' splice site-like sequence. *J Virol.* **75**:7763-7768.
45. **Pagani, F., E. Buratti, C. Stuani, M. Romano, E. Zuccato, M. Niksic, L. Giglio, D. Faraguna, and F. E. Baralle** 2000. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. *J Biol Chem.* **275**:21041-21047.
46. **Perez, I., J. G. McAfee, and J. G. Patton** 1997. Multiple RRM's contribute to RNA binding specificity and affinity for polypyrimidine tract binding protein. *Biochem.* **36**:11881-11890.

47. **Petersen-Mahrt, S. K., C. Estmer, C. Ohrmalm, D. A. Matthews, W. C. Russell, and G. Akusjarvi** 1999. The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. *EMBO J.* **18**:1014-1024.
48. **Philips, A. V., L. T. Timchenko, and T. A. Cooper** 1998. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science.* **280**:737-741.
49. **Savkur, R. S., A. V. Philips, and T. A. Cooper** 2001. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet.* **29**:40-47.
50. **Screaton, G. R., J. F. Cáceres, A. Mayeda, M. V. Bell, M. Plebanski, D. G. Jackson, J. I. Bell, and A. R. Krainer** 1995. Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors. *EMBO J.* **14**:4336-4349.
51. **Selvakumar, M., and D. M. Helfman** 1999. Exonic splicing enhancers contribute to the use of both 3' and 5' splice site usage of rat beta-tropomyosin pre-mRNA. *RNA.* **5**:378-394.
52. **Simard, M. J., and B. Chabot** 2000. Control of hnRNP A1 alternative splicing: an intron element represses use of the common 3' splice site. *Mol Cell Biol.* **20**:7353-7362.
53. **Singh, R., J. Valcárcel, and M. R. Green** 1995. Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science.* **268**:1173-1176.

54. **Southby, J., C. Gooding, and C. W. Smith** 1999. Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons. *Mol Cell Biol.* **19**:2699-2711.
55. **Staknis, D., and R. Reed** 1994. SR proteins promote the first specific recognition of Pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Mol Cell Biol.* **14**:7670-7682.
56. **Stoss, O., M. Olbrich, A. M. Hartmann, H. Konig, J. Memmott, A. Andreadis, and S. Stamm** 2001. The STAR/GSG Family Protein rSLM-2 Regulates the Selection of Alternative Splice Sites. *J Biol Chem.* **276**:8665-8673.
57. **Stoss, O., F. W. Schwaiger, T. A. Cooper, and S. Stamm** 1999. Alternative splicing determines the intracellular localization of the novel nuclear protein Nop30 and its interaction with the splicing factor SRp30c. *J Biol Chem.* **274**:10951-10962.
58. **Valcárcel, J., and F. Gebauer** 1997. Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. *Curr Biol.* **7**:R705-708.
59. **Valcárcel, J., R. Singh, P. D. Zamore, and M. R. Green** 1993. The protein Sex-lethal antagonizes the splicing factor U2AF to regulate alternative splicing of transformer pre-mRNA. *Nature.* **362**:171-175.
60. **Wagner, E. J., and M. A. Garcia-Blanco** 2001. Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol.* **21**:3281-3288.
61. **Wang, Z., H. M. Hoffmann, and P. J. Grabowski** 1995. Intrinsic U2AF binding is modulated by exon enhancer signals in parallel with changes in splicing activity. *RNA.* **1**:21-35.

62. **Yuan, Y., D. M. Li, and H. Sun** 1998. PIR1, a novel phosphatase that exhibits high affinity to RNA . ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem.* **273**:20347-20353.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Multiple copies of CE9 inhibit the utilization of a downstream 3' splice site. (A) CE9 is a highly conserved 38 nt-element in hnRNP A1. Schematic representation of the downstream portion of the hnRNP A1 alternative splicing unit with the distance of CE9 to the constitutive 3' splice site of exon 8 and the length of CE9 indicated in nucleotides. The alignment between the mouse and the human CE9 sequence shows a greater than 90% level of conservation. (B) Schematic representation of pre-mRNAs. The distance between the site of insertion and the 3' splice site is indicated in nucleotides. (C) Labeled pre-mRNAs were incubated in a HeLa nuclear extract for 2 h. Splicing products were run on an 8% acrylamide-8 M urea gel (C3' -/2x and C3' -/α) or 6.5% acrylamide-8 M urea gel (A3x and A3xα). A mixture (M) containing A3x and A3xα was analyzed to rule out the presence of a nonspecific inhibitor in the A3x RNA preparation (lane 5). (D) CE9 activity is mediated by a *trans*-factor. Splicing was performed in a HeLa nuclear extract preincubated for 10 min with increasing amounts of multiple copies RNA (3x9f) as a competitor (lanes 2 to 4 and 6 to 8). Each set of competition was performed with 0.5 fmoles of pre-mRNA and 62.5, 125 and 250 fmoles of 3x9f RNA. The position of the pre-mRNAs and various lariat products is indicated.

Fig. 2. A 25 kDa protein interacts with CE9. (A) The sequence of CE9 RNA and portions used in gel-shift assays is shown. Each RNA also contains at its 5' end 35 nt of unrelated sequence that corresponds to pBluescript II KS(+) RNA (K⁺). (B) Labeled transcripts were incubated for 15 min on ice in the presence (+) or the absence (-) of a HeLa nuclear extract. Complexes were separated on a non-denaturing 5% acrylamide gel. (C) Cross-

linking assays were performed in the presence of labeled transcripts incubated for 10 min at 30°C (lanes 1 and 2), or on ice in the presence of 0.1 mg of heparin (lanes 3 and 4), followed by UV irradiation. Samples were fractionated on a 12.5% polyacrylamide-SDS gel.

Fig. 3. A 25 kDa protein binds to a CE9 RNA column. (A) Sequence of the RNAs that were covalently linked to the agarose adipic-acid column. (B) Proteins bound to the different RNA columns were resolved on a 12.5% polyacrylamide-SDS gel and stained with silver nitrate. The position of some of the molecular weight markers is shown.

Fig. 4. Recombinant SRp30c binds specifically to CE9 RNA. Labeled transcripts (see Fig. 2) were incubated for 15 min on ice in the presence of 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 µg of GST-SRp30c or GST-ASF/SF2. Complexes were separated on a non-denaturing 5% acrylamide gel. Samples in lane 1 and 10 lack recombinant proteins.

Fig. 5. SRp30c is associated with the activity of CE9. Splicing reactions using a HeLa nuclear extract were preincubated for 10 min with 250 fmoles of 3x9f RNA as competitor (lanes 2 to 5 and lanes 7 to 10). Increasing amounts of Trx-His-SRp30c (0.75 and 1 µg) and 1 µg of GST-ASF/SF2 (A/S) were then added to the mixture which were further incubated for 10 min (lanes 3 to 5 and lanes 8 to 10) before the addition of the labeled A3x or A pre-mRNA. The splicing products resulting from a 2 h incubation at 30°C were resolved on an 6.5% acrylamide-8 M urea gel. The position of the pre-mRNAs and various lariat products is indicated.

Fig. 6. Increasing the concentration of SRp30c potentiates the activity of CE9 *in vitro*. Splicing reactions performed in a HeLa nuclear extract were preincubated for 10 min with increasing amounts of recombinant proteins (1 and 1.5 μ g of Trx-His-SRp30c and GST-ASF/SF2) followed by the addition of labeled A2x or the A2x α transcripts. Mock incubations were also performed as controls (lanes 1 and 6). A2x contains two copies of CE9 while A2x α contains two copies of the complementary sequence of CE9. Note that two copies of CE9 is not sufficient to promote a consistent reduction in splicing efficiency *in vitro* in this system (compare lane 1 with lane 6). Splicing products were resolved on an 6.5% acrylamide-8 M urea gel. The position of the pre-mRNAs and various lariat products is indicated.

Fig. 7. The binding of SRp30c to CE9 correlates with repression activity. (A) Sequences of the various RNAs. CE9.16 was used in the RNA affinity chromatography (see Fig. 3). Underlined nucleotides indicate mutations relative to the wild-type CE9.7 sequence. (B) Radiolabeled transcripts were incubated for 15 min on ice in the absence (lanes 1, 5, 9 and 13) or the presence of increasing amounts of GST-SRp30c (0.1, 0.25, 0.5 and 1 μ g). Complexes were separated on a non-denaturing 5% acrylamide gel. (C) Splicing reactions were performed with a labeled adenovirus or C3' pre-mRNA derivatives (see Fig.1B). The adenovirus substrates contains 3 copies of the shortest CE9.7 minimal sequence or mutant versions while the C3' variants contain 2 copies of CE9.7 or mutant versions. The adenovirus and C3' splicing products were resolved on a 8% acrylamide-8 M urea gel and a 11% acrylamide-8 M urea gel (lanes 1- 3 and lanes 4 to 7, respectively). The position of the pre-mRNAs and various lariat products is indicated.

Fig. 8. A purine-rich element bound by the SR protein ASF/SF2 does not elicit repression when positioned in the intron. (A) Sequence of 3xPu and 3xCE9.7. (B) Radiolabeled transcripts were incubated for 15 min on ice in the absence (lanes 1 and 10) or in the presence of GST-SRp30c and GST-ASF/SF2 (0.1, 0.5 and 1 μ g). Complexes were separated on a non-denaturing 5% acrylamide gel. (C) Splicing reactions were performed with labeled adenovirus containing either 3 copies of CE9.7 or 3 copies of the purine-rich element. Adenovirus splicing products were resolved on a 8% acrylamide-8 M urea gel. Note that the difference in the migration of pre-mRNAs and lariat products between A3xCE9.7 and A3xPu is due to extra nucleotides from pBluescript II KS(+) in the A3xCE9.7 substrate.

Diagram illustrating the structure of the CE9 gene and the sequence alignment between Mouse and Human sequences.



The gene structure shows exons 7B, 38, 119, and 8, with introns indicated by lines and exons by boxes. The CE9 gene is shown with a break in the middle.


Sequence alignment (Mouse vs. Human):


Mouse: CUGGAUUAUU-AACUGAAUGCCUCACUCAGAGAAUGAA

Human: CUGGAUUAUUC AACUGAAUGCCU UUCC CAGAGAAUGAA

The alignment shows a deletion of 11 nucleotides in the human sequence compared to the mouse sequence.

$C3' - /2x$  

$A3x$ 

A 

ori —

C3-12x
C3-1α

7B-Ad2

7B-Ad2

7B-Ad2

pre-mRNAs

1 2

68

CE9	CUGGAUUAUUCAACUGAAUGCCUCACUCAGAGAAUGAA
CE9.17	CUGGAUUAUUCAACUGA
CE9.12d	UCAGAGAAUGAA

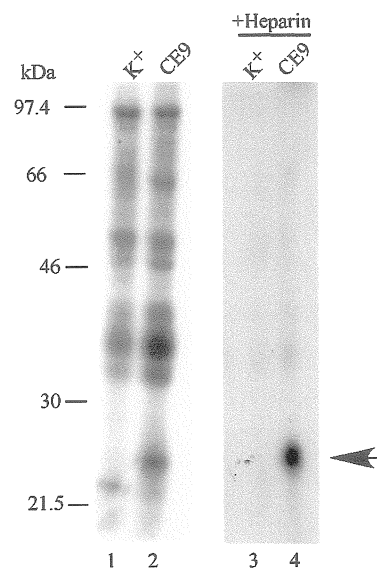
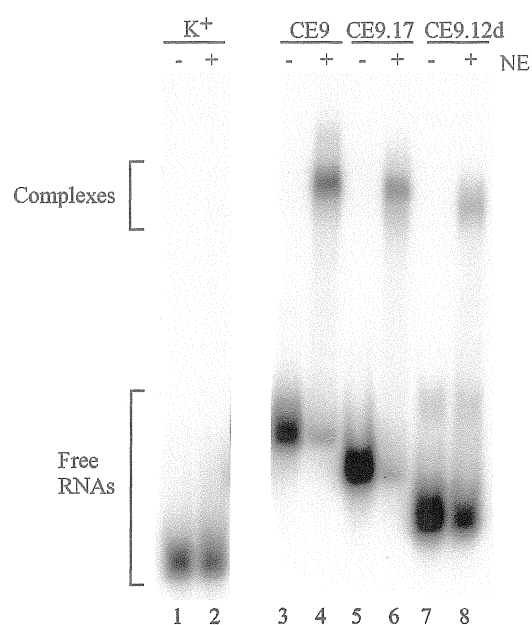


Figure 2
69

A

C AAUGUCUGCUAACUGG
CE9.16 CUGGAUUAUUCAACUG

B

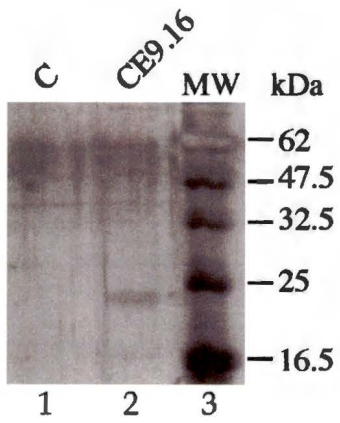


Figure 3
70

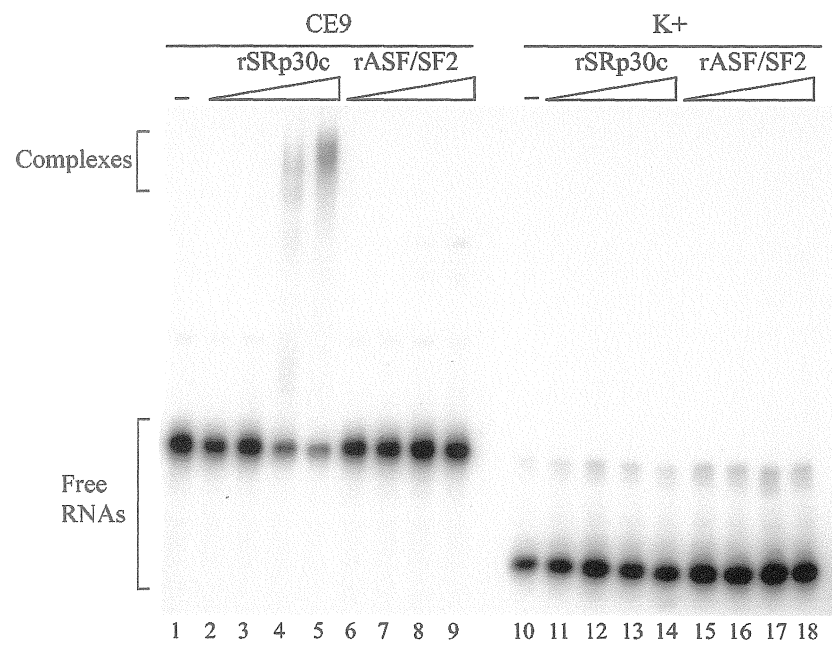


Figure 4
71

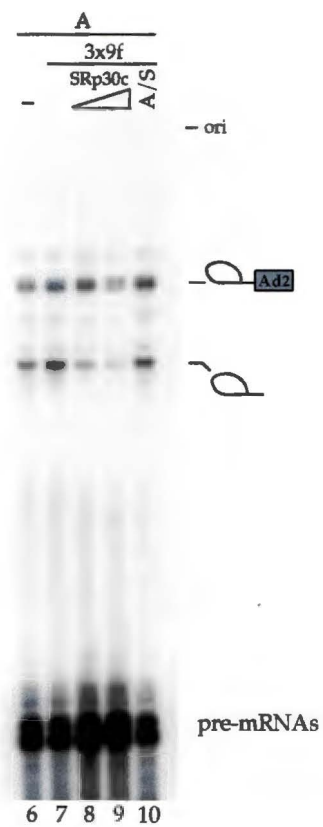


Figure 5
72

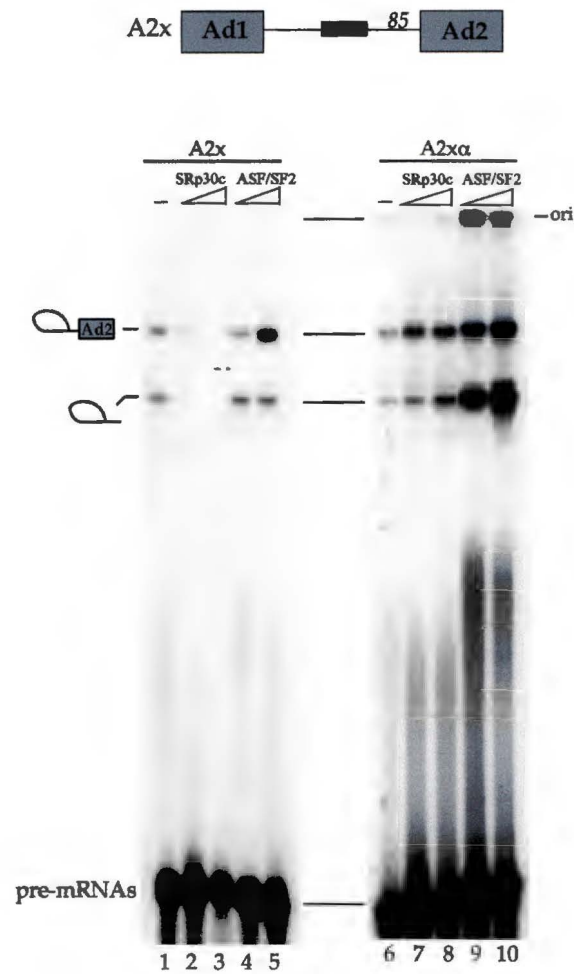
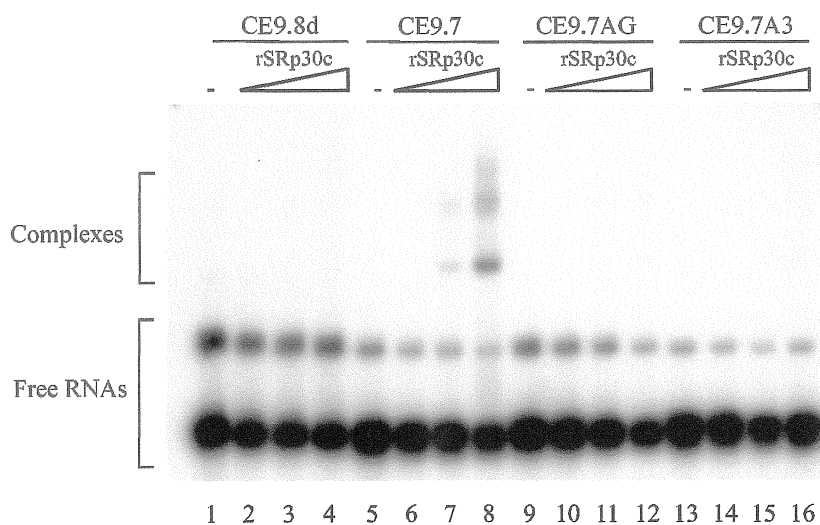


Figure 6
73

A

CE9.16 CUGGAUUAUUAACUG
 CE9.8d AUUCAACU
 CE9.7 CUGGAUU
 CE9.7AG CUGAGUU
 CE9.7A3 CUAGAUAU

B



C

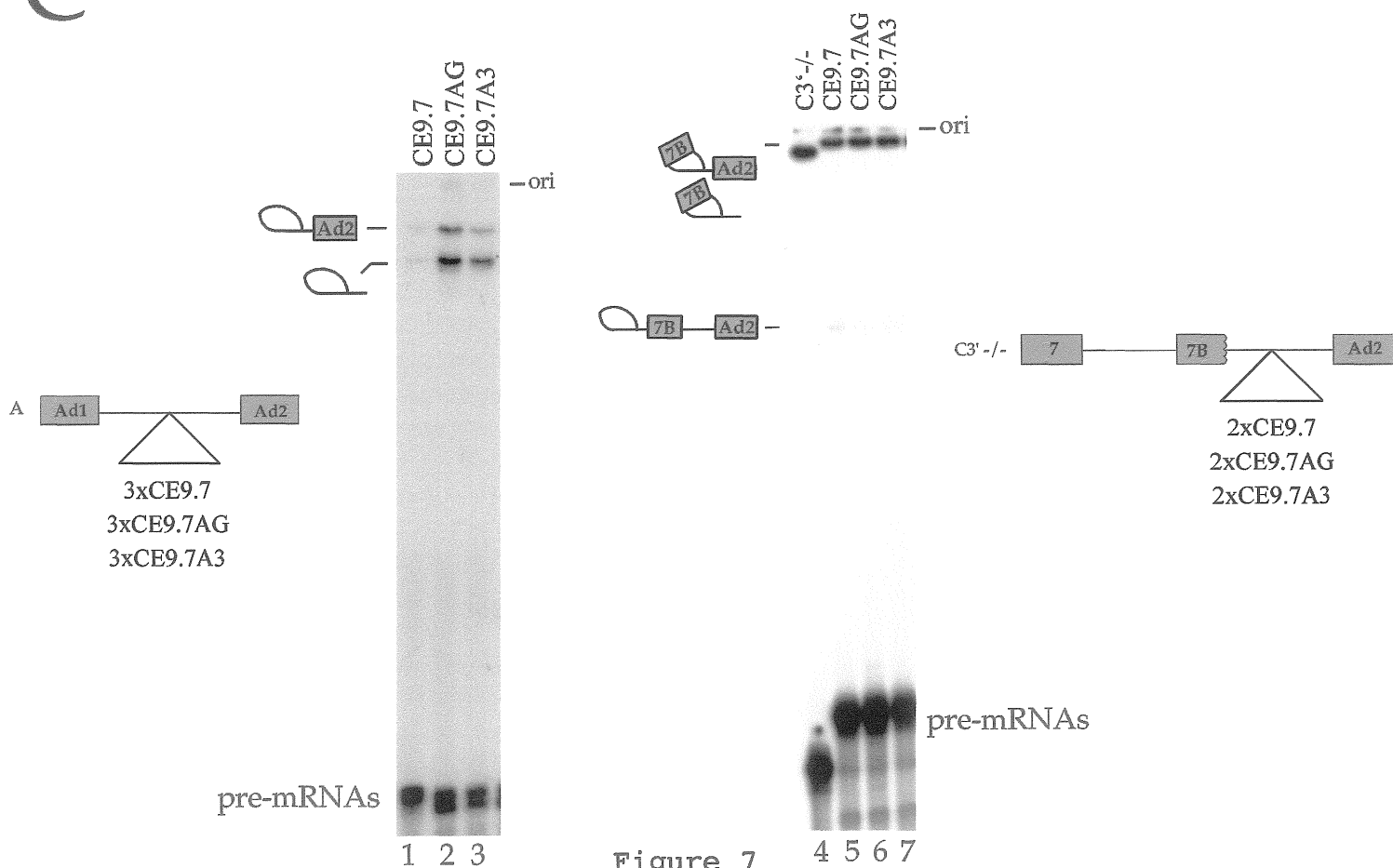


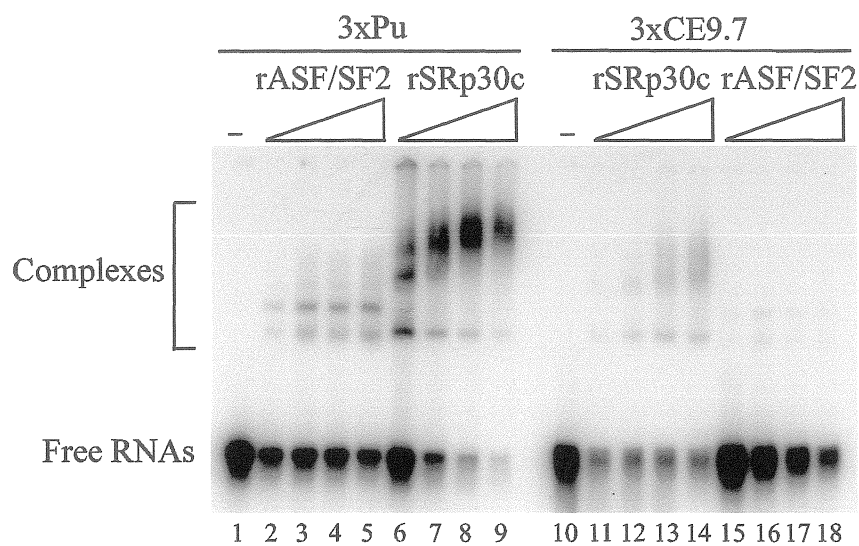
Figure 7
74

A

3xPu GGGAGGACAAGCUGGGGAGGACAAGCUGGGGAGGACAGCUG

3xCE9.7 CUGAGUUCAAGCUGCUGAGUUCAAGCUGCUGAGUUCAGCUG

B



C

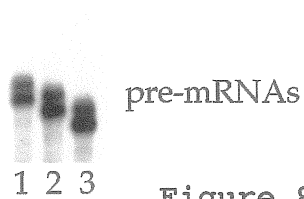
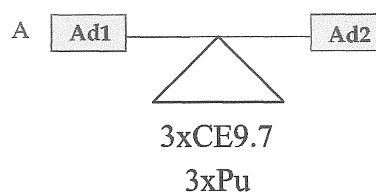
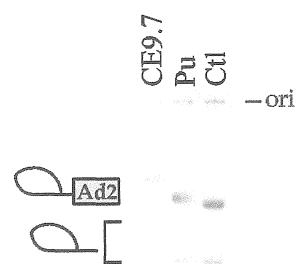


Figure 8
75

DISCUSSION

Notre laboratoire utilise le gène hnRNP A1 comme modèle pour étudier les séquences régulatrices et les facteurs cellulaires contrôlant l'épissage alternatif chez les mammifères. L'inclusion ou l'exclusion de l'exon 7B dans l'ARN pré-messager de hnRNP A1 permet de générer deux ARN messagers encodant respectivement la protéine hnRNP A1B et hnRNP A1. La comparaison de la séquence du gène hnRNP A1 de la souris avec celle du gène de l'homme a permis d'observer que la séquence de l'intron entre les exons constitutifs 6 et 7 est très peu conservée (Chabot et al., 1997). Par contre, il y a un très haut niveau de conservation pour les séquences introniques retrouvées de chaque côté de l'exon alternatif 7B (environ 70%, Chabot et al., 1997). Dans ces introns, on retrouve dix régions hautement conservées (appelées CE1 à CE10) qui pourraient potentiellement jouer un rôle important dans la régulation de l'épissage alternatif. Des études menées par notre laboratoire ont permis d'identifier que quatre de ces éléments conservés influencent l'épissage alternatif de l'exon 7B (Blanchette et Chabot, 1997; Blanchette et Chabot, 1999; Chabot et al., 1997). Une meilleure compréhension des mécanismes régissant l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager de hnRNP A1 pourrait permettre de mieux cerner le rôle des différents éléments régulateurs et les interactions entre eux qui modulent l'inclusion ou l'exclusion d'un simple exon alternatif.

Le but de mon étude était de caractériser la fonction d'un autre élément intronique appelé CE9, situé près du site d'épissage 3' de l'exon 8 du gène hnRNP A1. Cet élément de 38 nucléotides est conservé à plus de 90% entre la souris

et l'humain. J'ai donc utilisé diverses approches *in vitro* et *in vivo* afin d'éclaircir le rôle joué par l'élément CE9 dans la régulation de l'épissage alternatif.

L'élément CE9 réprime l'utilisation d'un site d'épissage 3'

Dans le premier chapitre, nous avons montré la capacité de l'élément CE9 à moduler l'épissage *in vivo* et *in vitro*. Les résultats obtenus indiquent que CE9 est un régulateur négatif affectant l'utilisation d'un site d'épissage 3'. L'insertion de multiples copies de CE9 dans l'intron d'une simple unité d'épissage (exon/intron/exon) empêche l'épissage *in vitro*. Cette activité est observée chez un ARN pré-messager d'adénovirus et dans un ARN pré-messager contenant l'exon 7B et l'exon 8 de hnRNP A1 (Figure 2; Simard et Chabot, 2000). L'insertion de trois copies de CE9 à sa position naturelle dans le minigène de hnRNP A1 compromet l'accumulation de produits complètement épissés (Figure 4; Simard et Chabot, 2000). De plus, l'insertion de l'élément CE9 entre deux sites d'épissage 3' réduit l'utilisation du site d'épissage situé en aval de celui-ci (Figure 3; Simard et Chabot, 2000). Finalement, la présence de CE9 dans un intron de l'ARN pré-messager modèle de globine réprime l'épissage de cet intron *in vitro* (Figure 5; Simard et Chabot, 2000).

Généralement, les éléments régulateurs négatifs affectent la sélection d'un site d'épissage en empêchant la reconnaissance de celui-ci. D'une part, certaines séquences forment une structure ARN-ARN stable avec le site d'épissage empêchant la reconnaissance soit d'un site d'épissage 5' par le snRNP U1 (Blanchette et Chabot, 1997; Hutton et al., 1998) soit du site de branchement par le snRNP U2 (Côté et Chabot, 1997). D'autre part, la liaison de protéines à des éléments négatifs peut

empêcher la liaison des facteurs d'épissage (Kanopka et al., 1996; Lin et Patton, 1995; Petersen-Mahrt et al., 1999; Singh et al., 1995). Dans le cas de CE9, la reconnaissance du site d'épissage 3' n'est pas affectée car la liaison de snRNP U2 et de snRNP U4 a toujours lieu malgré l'incapacité d'épisser un ARN pré-messager contenant CE9 (Figure 7; Simard et Chabot, 2000).

Dans la littérature, on retrouve peu d'exemples d'éléments négatifs qui n'affectent pas la formation des complexes d'épissage. Dans certains de ces cas, la liaison de snRNPs à cette région permet la formation de complexes d'épissage non-fonctionnels (Hibbert et al., 1999; Kan et Green, 1999; McNally et McNally, 1998; Paca et al., 2001). L'exemple le mieux décrit est celui de l'élément négatif contenu dans un gène du virus du sarcome de Rous (RSV). Comme dans le cas de CE9, cet élément négatif n'affecte pas la formation d'un complexe dépendant du snRNP U2 (Gontarek et al., 1993). Il a été proposé que la liaison du snRNP U1 à cette région intronique entraîne la formation d'un spliceosome non-fonctionnel (Hibbert et al., 1999; McNally et McNally, 1998; Paca et al., 2001). Ce type de mécanisme ne semble pas être celui utilisé par CE9 étant donné que le complexe formé sur l'élément CE9 n'est pas sensible à la destruction individuelle des snRNPs U1, U2 et U4, ni au traitement de l'extrait nucléaire à la micrococcal nucléase (données non-publiées).

L'élément CE9 pourrait agir de façon nouvelle afin d'empêcher l'utilisation d'un site d'épissage 3'. Nos résultats suggèrent que CE9 affecte la communication entre le site d'épissage 5' et le site d'épissage 3' (appelée la définition de l'intron). La présence de CE9 entre un site d'épissage 5' et un site d'épissage 3' serait donc essentielle afin de conférer à cet élément son activité. Ce positionnement spécifique

expliquerait pourquoi CE9 n'affecte pas l'épissage lorsque positionné en aval d'un site d'épissage 3' (données non-publiées).

L'activité de CE9 est médiée par la liaison de la protéine SRp30c

Plusieurs résultats indiquent que l'activité négative de l'élément CE9 nécessite la liaison d'une ou de plusieurs protéines. Premièrement, CE9 peut agir sur divers ARN pré-messagers. Deuxièmement, l'ajout d'ARN compétiteur correspondant à CE9 rétablit le profil d'épissage affecté par la présence de CE9 (Figure 6; Simard et Chabot, 2000 et Figure 1D; Simard et Chabot, manuscrit soumis). Troisièmement, CE9 forme un complexe spécifique avec des facteurs dans un extrait nucléaire (Figure 2B; Simard et Chabot, manuscrit soumis). Nous avons montré qu'une protéine de 25 kDa interagissait de façon spécifique avec l'ARN de CE9 (Figure 2C; Simard et Chabot, manuscrit soumis). Nous avons isolé ce facteur de 25 kDa à l'aide d'une chromatographie d'affinité utilisant les 16 premiers nucléotides composant l'élément CE9 (Figure 3; Simard et Chabot, manuscrit soumis). Par la suite, la spectrométrie de masse a permis d'identifier cette protéine comme étant SRp30c, un membre de la famille des protéines SR.

Plusieurs évidences supportent le rôle de la protéine SRp30c dans l'activité de CE9. Premièrement, une version recombinante de SRp30c peut lier de façon spécifique l'ARN de CE9 (Figure 4; Simard et Chabot, manuscrit soumis). Deuxièmement, l'ajout de SRp30c recombinant à un extrait nucléaire réprime spécifiquement l'épissage d'un ARN pré-messager contenant CE9 (Figures 5 et 6; Simard et Chabot, manuscrit soumis). Finalement, des mutations ponctuelles dans

l'élément CE9 affectent la liaison de SRp30c et inhibent l'action de CE9 (Figure 7; Simard et Chabot, manuscrit soumis). Il est donc clair que la protéine SRp30c joue un rôle important dans l'activité inhibitrice de CE9. D'autre part, il semble qu'une autre protéine nucléaire pourrait contribuer avec SRp30c à l'activité de CE9 en se liant à une autre région de CE9 qui n'est pas liée par SRp30c. Ceci est suggéré par le fait que les huit premiers nucléotides de CE9 liés par SRp30c ne semblent pas suffisants pour permettre l'activité complète de CE9 dans un contexte de compétition entre deux sites d'épissage 3' (Figure 7C, Simard et Chabot, manuscrit soumis). Certaines études ont permis d'identifier les protéines SAF-B, YB5323, rSlm2 et Nop30 comme capable d'interagir avec SRp30c (Nayler et al., 1998; Stoss et al., 1999; Stoss et al., 2001). Parmi ces facteurs, les protéines rSlm2 et Nop30 peuvent moduler l'épissage alternatif *in vivo* et l'activité de la protéine Nop30 est augmentée par une co-transfection avec la protéine SRp30c (Stoss et al., 1999; Stoss et al., 2001). Malgré le fait que leur liaison à CE9 n'est pas examinée, les protéines rSlm2 et Nop30 demeurent des candidats intéressants pouvant potentiellement contribuer avec SRp30c à l'activité de CE9. De plus, SRp30c pourrait faciliter le recrutement d'une de ces protéines à CE9.

Le rôle joué par SRp30c dans une activité négative sur l'épissage est peu commun. Généralement, le rôle des protéines SR est associé à une activation: à titre de facteurs essentiels pour l'épissage ou comme agents stimulateurs lorsque liés à une région exonique activatrice (pour revue voir Graveley, 2000). Il existe peu de cas où la répression de l'épissage implique un membre de la famille des protéines SR. On a associé la liaison d'une protéine SR à l'élément intronique négatif de RSV (décrit

plus haut) pouvant être importante pour son activité (McNally et McNally, 1996; McNally et McNally, 1998). Dans ce cas, il a été proposé que la liaison de la protéine SR pourrait promouvoir la liaison du snRNP U1 à cet élément (Hibbert et al., 1999; McNally et McNally, 1998; Paca et al., 2001).

Un deuxième exemple se retrouve dans l'ARN pré-messager IIIa d'adénovirus où un élément répresseur intronique (appelé 3RE) est lié par des protéines SR (Kanopka et al., 1996). Malgré le fait que dans ce système SRp30c a la capacité de lier cet élément et de réprimer l'épissage, la contribution de SRp30c dans l'inhibition de l'épissage reste à démontrer étant donné qu'une protéine SR plus abondante, ASF/SF2, peut elle aussi lier cet élément et réprimer l'épissage (Kanopka et al., 1996; Petersen-Mahrt et al., 1999). Comparativement, notre étude a montré qu'ASF/SF2 lie faiblement CE9 et que cette protéine est incapable de promouvoir la répression de l'épissage d'un ARN pré-messager contenant CE9 (Figure 5 et 6; Simard et Chabot, manuscrit soumis). D'autre part, CE9 ne semble pas agir de la même façon que l'élément répresseur retrouvé dans l'ARN pré-messager IIIa d'adénovirus. Contrairement à cet élément, CE9 ne peut activer l'épissage lorsque situé en aval d'un site d'épissage 3' (Kanopka et al., 1996 et données non-montrées). Ensuite, la proximité de l'élément 3RE du site de branchement semble responsable de l'interférence avec la liaison du snRNP U2 au site de branchement (Kanopka et al., 1996; Petersen-Mahrt et al., 1999). Dans le cas de CE9, plusieurs indications nous suggèrent un mécanisme différent. Premièrement, la liaison du snRNP U2 n'est pas affectée (Figure 7; Simard et Chabot, 2000). Deuxièmement, dans tous les ARNs modèles utilisés, CE9 est situé à plus de 80 nucléotides du site de branchement.

Troisièmement, l'inhibition de CE9 se produit même lorsque l'élément se situe à plus de 300 nucléotides du site de branchement (données non-publiées). L'ensemble de ces faits nous amènent à conclure que les activités de l'élément 3RE et de l'élément CE9 sont probablement médiées par des mécanismes différents.

La présence de sites de liaison dans un intron pour les protéines SR n'est pas toujours associée avec une inhibition de l'épissage. Dans le cas du gène de la tropomyosine, des sites naturels de liaison pour des protéines SR ont été associés à une activité activatrice (Gallego et al., 1997). Notre groupe a aussi observé que le positionnement dans un intron de l'élément activateur retrouvé dans l'exon ED1 du gène fibronectine humain n'inhibait pas l'épissage (Lavigueur et al., 1993). De plus, nos résultats montrent que l'insertion de sites de liaison pour ASF/SF2 à la même position que CE9 ne promouvoit pas la répression de l'épissage (Figure 8; Simard et Chabot, manuscrit soumis).

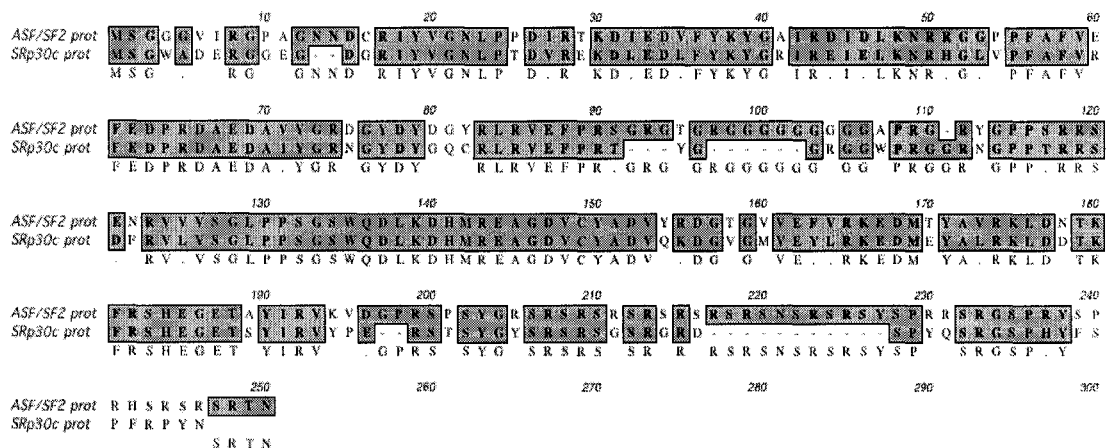


Figure 9. Comparaison de la séquence en acides aminés entre les protéines SR ASF/SF2 et SRp30c. Les boîtes grises représentent les acides aminés conservés dans les deux protéines. La position des acides aminés est indiquée.

À la lumière de ces observations, il serait fort intéressant de déterminer la caractéristique de la protéine SRp30c qui lui confère son activité inhibitrice. Lorsqu'on compare les séquences en acides aminés de SRp30c et ASF/SF2, on remarque que près de 75% des acides aminés sont identiques (Figure 9). Par contre, on retrouve des différences importantes dans les portions C-terminales de ces deux protéines: le domaine riche en résidus arginine et sérine (domaine RS) est plus court chez SRp30c (cinq dipeptides en comparaison à douze pour ASF/SF2; Figure 9) et les huit derniers acides aminés de ces deux protéines sont fort distincts. Ces particularités pourraient permettre à ces deux protéines d'affecter l'épissage de façon différente.

La distinction entre le nombre de résidus RS constituant la région C-terminale de SRp30c et ASF/SF2 pourrait influencer leurs fonctions cellulaires. Des études *in vitro* ont montré que les domaines RS possèdent une certaine spécificité dans leurs fonctions. Lorsque les domaines RS provenant de six protéines SR humaines différentes sont fusionnés au domaine de liaison à l'ARN de la protéine MS2, le potentiel d'activation de l'épissage de chacun des domaines RS est quantitativement différent (Graveley et al., 1998). En fait, le potentiel de chacun varie directement avec le nombre de dipeptides arginine/sérine présents dans le domaine RS (Graveley et al., 1998). De plus, lorsqu'on remplace les RRM des protéines SR par un domaine de liaison à l'ARN provenant du phage MS2, le domaine RS peut fonctionner comme un domaine d'activation de l'épissage, ce qui suggère que ce domaine possède une fonction indépendante des domaines de liaison à l'ARN (Graveley et al., 1998).

Par ailleurs, on retrouve dix sérines supplémentaires dans la région C-terminale de ASF/SF2 comparativement à SRp30c. Ces acides aminés retrouvés dans les domaines RS sont des cibles potentielles pour la phosphorylation. Cette différence pourrait permettre à ces protéines de jouer un rôle distinct dans l'épissage puisque la phosphorylation des protéines SR peut influencer à la fois leur liaison à l'ARN (Tacke et al., 1997; Xiao et Manley, 1997) et leurs capacités d'interaction avec d'autres protéines (Xiao et Manley, 1997; Xiao et Manley, 1998; Yeakley et al., 1999). L'hyper-phosphorylation ou l'hypo-phosphorylation des protéines SR peut même inhiber leur activité (Kanopka et al., 1998; Prasad et al., 1999; Sanford et Bruzik, 1999). L'exemple le mieux documenté à ce sujet est celui de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager IIIa d'adénovirus. Suite à une infection adénovirale, la modulation du niveau de phosphorylation apparaît importante pour contrôler l'activité des protéines SR au niveau de l'épissage alternatif (Estmer Nilsson et al., 2001; Kanopka et al., 1998). Par ailleurs, le niveau de phosphorylation de protéines SR varie au cours du développement du nématode *Ascaris lumbricoides* et cette variation semble importante pour contrôler l'activation de l'épissage de certains ARN pré-messagers au cours du développement (Sanford et Bruzik, 1999). Jusqu'à présent, on a identifié trois types de protéines kinases capables de phosphoryler les domaines RS *in vitro*: SRPK1 (Gui et al., 1994) et SRPK2 (Wang et al., 1998), Clk/Sty (Colwill et al., 1996) et l'ADN topoisomerase I (Rossi et al., 1996). La différence de l'état de phosphorylation entre ASF/SF2 et SRp30c pourrait donc affecter leurs fonctions. La phosphorylation du domaine RS de SRp30c pourrait donc

affecter son interaction avec certains facteurs cellulaires et empêcher la communication entre le site d'épissage 5' et le site d'épissage 3'.

La modulation des sites d'épissage communs comme stratégie pour moduler l'épissage alternatif

Généralement, les régions impliquées dans la régulation de l'épissage d'un exon alternatif affectent soit la reconnaissance ou l'utilisation des sites d'épissage de cet exon. Par ailleurs, affecter l'utilisation des sites d'épissage communs dans des unités d'épissage alternatifs pourrait être tout aussi important afin de produire le bon ratio des différents ARN messagers. Dans ce contexte, les sites d'épissage communs se retrouvent en compétition avec les sites d'épissage alternatifs. Si les sites d'épissage communs sont reconnus trop efficacement, les sites d'épissage alternatifs ne seront pas utilisés. Bien que ces sites d'épissage communs soient souvent sous-optimaux (déviants de la séquence consensus), peu d'études ont décrit des éléments affectant leur utilisation. Des éléments activateurs retrouvés dans des exons communs 3' et 5' ont été identifiés respectivement dans l'unité d'épissage alternatif ED1 du gène de fibronectine et dans celui du gène *CGRP* (Lavigueur et al., 1993; Yeakley et al., 1993). Dans ces situations, le rôle joué par ces éléments dans leur contexte naturel reste toujours à déterminer. D'autre part, nous avons montré que dans le cas de l'unité d'épissage alternatif du gène *NCAM*, la présence d'un élément activateur dans l'exon commun 5' (E17) diminue l'inclusion de l'exon alternatif E18 situé en aval dans les cellules neuronales (Côté et al., 1999, voir annexe 1). L'élément CE9 est le premier exemple d'élément régulateur intronique affectant l'utilisation d'un exon

commun 3'. Nos résultats permettent donc de mettre en lumière le fait que pour une unité d'épissage alternatif contenant un exon de type cassette le contrôle cible non-seulement les sites d'épissage de l'exon alternatif mais aussi les sites d'épissage communs.

De multiples éléments pour contrôler l'épissage alternatif de l'exon 7B

La caractérisation de l'élément CE9 s'ajoute aux quatre autres éléments déjà connus qui sont impliqués dans l'exclusion de l'exon 7B de l'ARN messager. Deux éléments situés de part et d'autre de l'exon 7B, CE1 et CE4, ont la capacité de lier la protéine hnRNP A1 et de favoriser la sélection du site d'épissage 5' de l'exon 7 *in vitro*, et de promouvoir l'exclusion de l'exon 7B *in vivo* (Blanchette et Chabot, 1999; Chabot et al., 1997). De plus, l'élément CE6 situé en aval de l'exon 7B forme un duplexe ARN-ARN avec le site d'épissage 5' de l'exon 7B empêchant son utilisation *in vitro* et favorisant l'exclusion de l'exon 7B *in vivo* (Blanchette et Chabot, 1997). Finalement, l'élément CE4m situé en aval de l'exon 7B favorise lui aussi l'exclusion de l'exon 7B *in vivo* en affectant négativement l'utilisation du site d'épissage 3' de cet exon (Blanchette et Chabot, 1999). Tous ces éléments sont donc importants pour favoriser l'exclusion de l'exon 7B conduisant à la synthèse de la protéine hnRNP A1. L'élément CE9 est le seul élément régulateur caractérisé jusqu'à présent, qui pourrait favoriser l'inclusion de l'exon 7B. Le duplexe ARN-ARN formé par CE6 et le site d'épissage 5' de l'exon 7B modifie la conformation de l'ARN pré-messager de façon à ce que l'inclusion ou l'exclusion de l'exon 7B soit décidée par l'utilisation du site d'épissage 3' de l'exon 7B ou celui de l'exon 8 (Figure 10A). Les éléments CE4m et

CE9 auraient donc la capacité d'influencer cette décision. Le premier agit négativement sur la sélection du site d'épissage 3' de l'exon 7B et le second agit négativement sur le site d'épissage 3' de l'exon 8. Une régulation fine des niveaux d'expression de la protéine SRp30c liant CE9 et du facteur cellulaire liant CE4m, pourrait donc contrôler l'inclusion ou l'exclusion de l'exon alternatif 7B (Figure 10).

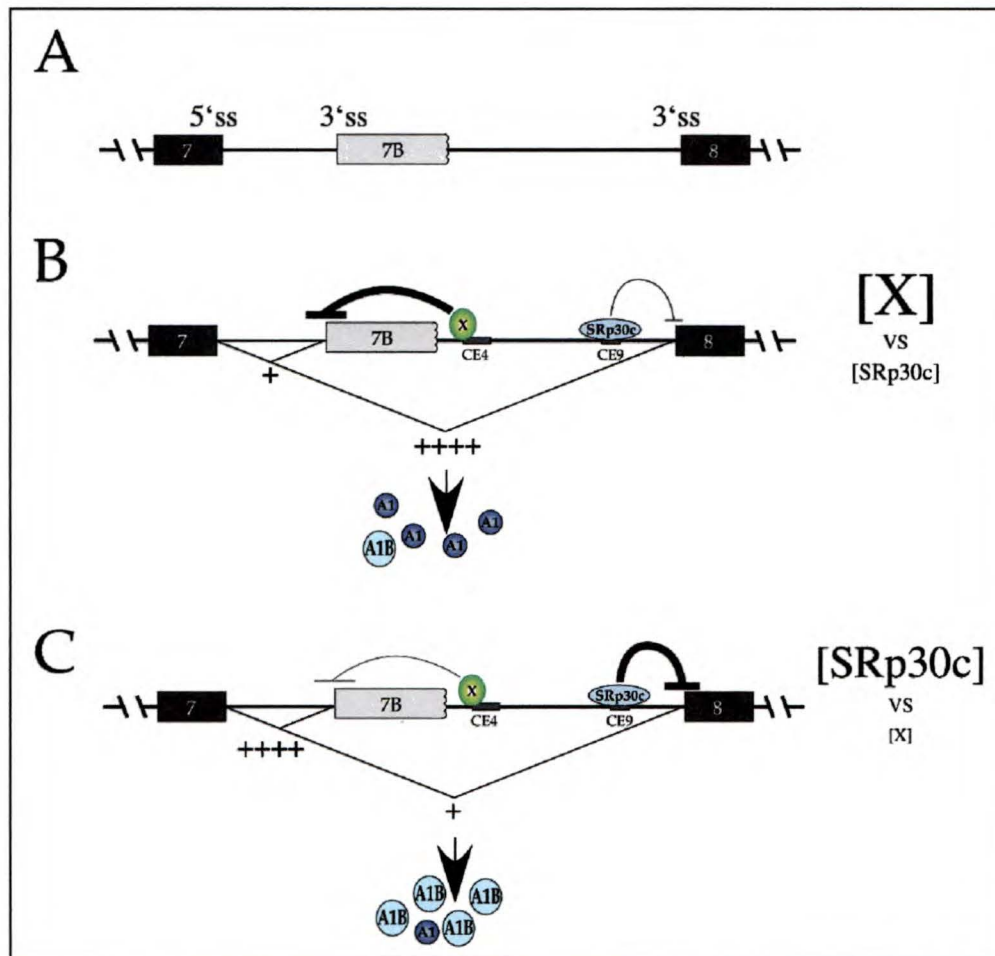


Figure 10. L'épissage alternatif de l'exon 7B pourrait être modulé par les éléments affectant les sites d'épissage 3'. **A:** La formation de la structure ARN-ARN entre l'élément CE6 et le site d'épissage 5' de l'exon 7B transforme l'unité d'épissage en une compétition de sites d'épissage 3'. **B:** Une concentration élevée du facteur (X) liant la portion 5' de CE4 (CE4m) inhiberait l'utilisation du site d'épissage 3' de l'exon 7B conduisant à la synthèse de la protéine hnRNP A1. **C:** Lorsque que la protéine SRp30c serait plus abondante que le facteur X, l'utilisation du site d'épissage 3' de l'exon 8 serait fortement atténuée ce qui favoriserait le pairing entre le site d'épissage 5' de l'exon 7 et le site d'épissage 3' de l'exon 7B conduisant à la formation de la protéine hnRNP A1B.

Jusqu'à présent, nous avons été incapables d'observer un changement significatif de l'inclusion de l'exon 7B suite à la transfection du minigène de hnRNP A1 portant une délétion de CE9 (Figure 4A; Simard et Chabot, 2000). Par contre, l'addition de trois copies de CE9 dans le minigène de hnRNP A1 empêche l'utilisation du site d'épissage 3' de l'exon 8 (Figure 4A; Simard et Chabot, 2000). Malgré le fait qu'une seule copie de CE9 puisse affecter l'inclusion d'un minigène de globine *in vivo* (Figure 4C; Simard et Chabot, 2000), l'activité de CE9 dans le minigène de hnRNP A1 peut être difficile à observer à cause de la présence d'autres éléments régulateurs parfois plus puissants favorisant l'exclusion de l'exon 7B dans les cellules HeLa. De plus, comme la détection de l'ARN messenger de SRp30c dans la lignée cellulaire HeLa requiert l'utilisation d'une technique d'amplification par PCR (Screaton et al., 1995), la concentration de SRp30c dans ces cellules est possiblement faible. Par ailleurs, l'expression de l'ARN messenger de SRp30c semble varier de façon histo-spécifique (Screaton et al., 1995). Il serait intéressant de déterminer si les niveaux variables de la protéine SRp30c dans différents types cellulaires sont associés à une augmentation de la production de la protéine hnRNP A1B.

La nécessité de posséder plusieurs éléments régulateurs associés à un simple évènement d'épissage alternatif pourrait représenter une façon efficace de réguler l'utilisation d'un site d'épissage. On retrouve, notamment chez les mammifères, un nombre grandissant de gènes où un seul évènement d'épissage est régulé par un ensemble d'éléments positifs ou négatifs (quelques exemples sont décrits dans la Figure 4). Ainsi, il pourrait être nécessaire d'affecter simultanément l'activité de

plusieurs éléments régulateurs afin de modifier le patron d'épissage. De plus, la présence de multiples éléments régulateurs permet d'adapter l'épissage alternatif d'un ARN pré-messager à différentes situations cellulaires en réponse à des conditions spécifiques à certains tissus ou de développement.

Par ailleurs, la présence de plusieurs éléments régulateurs pourrait jouer un rôle temporel afin d'assurer la bonne sélection des partenaires d'épissage dans un ARN messager naissant. De plus en plus d'études suggèrent que la maturation des ARN pré-messagers se fait de façon cotranscriptionnelle (revues dans Hirose et Manley, 2000; Proudfoot, 2000). Plusieurs évidences suggèrent que les facteurs d'épissage s'associent à l'ARN dès sa synthèse par l'ARN polymérase de type II. Premièrement, les foyers de transcription colocalisent avec les régions riches en facteurs d'épissage retrouvées dans le noyau (Misteli et al., 1997; Misteli et Spector, 1999). Deuxièmement, plusieurs facteurs d'épissage (i.e. les protéines SR et les snRNPs) interagissent avec la queue CTD de l'ARN polymérase II (Kim et al., 1997; Mortillaro et al., 1996; Vincent et al., 1996; Yuryev et al., 1996). Troisièmement, une ARN polymérase II hautement phosphorylée favorise l'épissage *in vitro* (Hirose et al., 1999). Quatrièmement, la nature du promoteur peut affecter le patron d'épissage du gène sous son contrôle (Cramer et al., 1997; Kadener et al., 2001). On peut donc penser que l'utilisation des sites d'épissage nouvellement synthétisés est contrôlée par un élément régulateur jusqu'à la synthèse du partenaire d'épissage adéquat. Dans le cas du gène hnRNP A1, la synthèse de CE1, de CE4 et de CE4m pourrait empêcher l'association du site d'épissage 5' de l'exon 7 et du site d'épissage de l'exon 7B via une interaction des protéines hnRNP A1 liant CE1 et CE4 et par l'effet négatif du

facteur liant CE4m (Figure 11B). L'épissage de l'intron entre l'exon 7B et l'exon 8 serait atténué par la synthèse de CE6 qui empêche la reconnaissance du site d'épissage 5' de l'exon 7B. Par la suite, la synthèse de CE9 diminue l'utilisation du site d'épissage 3' de l'exon 8 ce qui empêche son pairage précoce avec le site d'épissage 5' de l'exon 7. Une fois l'unité d'épissage alternatif de l'ARN pré-messager de hnRNP A1 complètement transcrit, la machinerie d'épissage peut maintenant associé les bons partenaires d'épissage afin de produire les ARN messagers contenant ou non l'exon 7B.

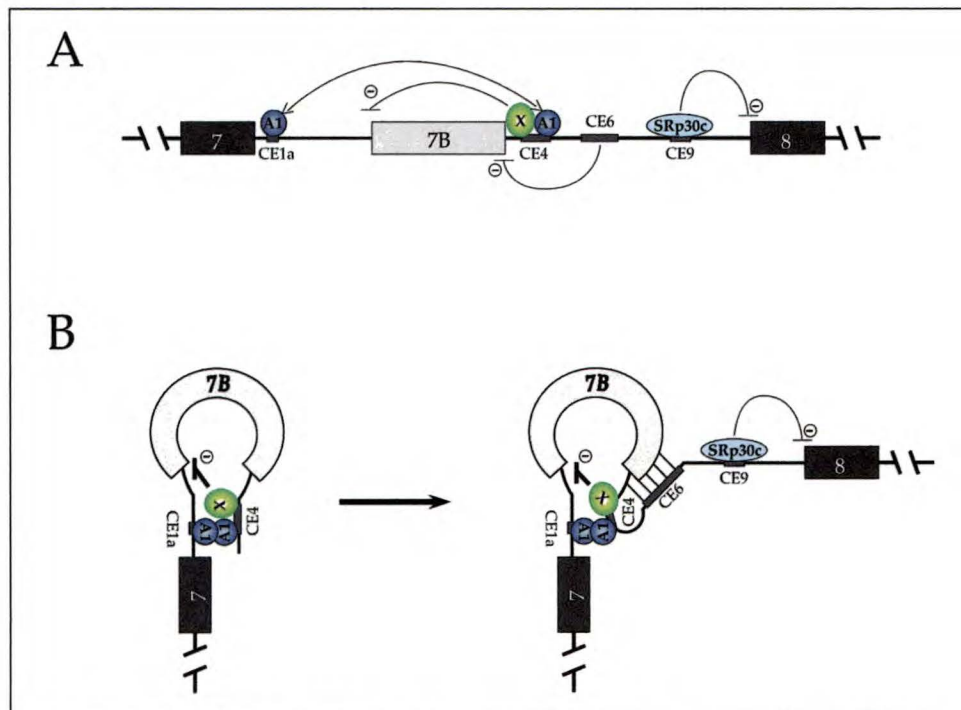


Figure 11. Modèle du rôle des éléments conservés dans le contrôle de l'épissage alternatif de l'exon 7B. **A:** Les éléments CE1a et CE4 sont liés par la protéine hnRNP A1, l'élément CE6 forme un duplexe ARN-ARN avec le site d'épissage 5' de l'exon 7B et l'élément CE9 est lié par SRp30c et réprime le site d'épissage 3' de l'exon 8. **B:** Lors de la synthèse de l'ARN pré-messager, la liaison des molécules de hnRNP A1 et l'effet négatif du facteur liant CE4m pourraient empêcher l'épissage entre l'exon 7 et l'exon 7B jusqu'à la synthèse du site d'épissage 3' de l'exon 8.

CONCLUSIONS

Mon étude a permis de caractériser un nouvel élément intronique retrouvé dans l'ARN pré-messager de hnRNP A1, capable de moduler la sélection d'un site d'épissage 3' commun. Cette découverte appuie l'importance de contrôler à la fois la sélection des sites d'épissage alternatifs ainsi que les sites d'épissage communs. À la lumière de mes résultats, une étude approfondie des régions adjacentes aux sites d'épissage 5' et 3' communs, impliqués dans un unité d'épissage alternatif de d'autres ARN pré-messager modèles, permettra de démontrer l'importance de ce mécanisme dans d'autres contextes.

D'autre part, l'implication de SRp30c dans la modulation négative de la sélection d'un site d'épissage 3' médié par CE9 est la première fonction spécifique associée à cette protéine. De plus, l'identification de SRp30c comme agent de contrôle démontre la versatilité des régulateurs d'épissage alternatif; les membres de la famille des protéines SR ont différentes activités qui peuvent être induites par la liaison à des éléments introniques et/ou exoniques. Il serait donc intéressant de déterminer quels sont les attributs spécifiques de SRp30c qui lui confèrent la capacité d'inhiber l'épissage (comme par exemple: son état de phosphorylation ou un domaine protéique particulier).

Finalement, le mécanisme utilisé par CE9/SRp30c affectant négativement l'utilisation d'un site d'épissage 3' demeure une question importante à éclaircir étant donné que CE9/SRp30c n'affecte pas la reconnaissance initiale du site d'épissage 3' comme la majorité des inhibiteurs décrits jusqu'à présent. CE9/SRp30c pourrait

utiliser un tout nouveau mécanisme de régulation affectant la communication entre le site d'épissage 5' et le site d'épissage 3' et/ou en affectant le remodelage du spliceosome nécessaire afin de permettre la première étape de transestérification.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Dr Benoit Chabot, pour ses judicieux conseils, son éternel enthousiasme et sa grande disponibilité. Nos discussions ont toujours été très agréables et des plus appréciées. Merci de m'avoir laissé toute la latitude nécessaire afin d'obtenir un doctorat prolifique.

Je remercie les membres de notre laboratoire et plus particulièrement mes partenaires de la première heure, Hélène, Jocelyn, Johanne, Marco et Stephen, qui m'ont appuyé lors de mes premiers pas dans le monde de la biologie moléculaire.

Je remercie également tous les membres du Département de Microbiologie et d'Infectiologie pour leur aide, tout particulièrement Serge et Bruno pour les nombreuses discussions enflammées ainsi que le groupe des randonneurs du dimanche avec qui j'ai oxygéné mes neurones.

Je tiens aussi à remercier le FCAR/FRSQ Santé pour m'avoir financièrement appuyé au cours de mes études doctorales.

Je remercie les Docteurs Jamal Tazi, Claude Asselin et Shérif Abou Elela d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse, spécialement le Dr Tazi qui brave le froid du Québec afin de participer à ma soutenance.

Et finalement, merci à Anne-Julie et à mes parents.

RÉFÉRENCES

- Abovich, N., et Rosbash, M. (1997). Cross-intron bridging interactions in the yeast commitment complex are conserved in mammals, *Cell* 89, 403-12.
- Amendt, B. A., Hesslein, D., Chang, L. J., et Stoltzfus, C. M. (1994). Presence of negative and positive cis-acting RNA splicing elements within and flanking the first tat coding exon of human immunodeficiency virus type 1, *Mol Cell Biol* 14, 3960-70.
- Ashiya, M., et Grabowski, P. J. (1997). A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart, *RNA* 3, 996-1015.
- Bai, Y., Lee, D., Yu, T., et Chasin, L. A. (1999). Control of 3' splice site choice in vivo by ASF/SF2 and hnRNP A1, *Nucleic Acids Res* 27, 1126-34.
- Barnard, D. C., et Patton, J. G. (2000). Identification and characterization of a novel serine-arginine-rich splicing regulatory protein, *Mol Cell Biol* 20, 3049-57.
- Berget, S. M. (1995). Exon recognition in vertebrate splicing, *J Biol Chem* 270, 2411-4.
- Berglund, J. A., Abovich, N., et Rosbash, M. (1998). A cooperative interaction between U2AF65 and mBBP/SF1 facilitates branchpoint region recognition, *Genes & Dev* 12, 858-67.

- Berglund, J. A., Chua, K., Abovich, N., Reed, R., et Rosbash, M. (1997). The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC, *Cell* 89, 781-7.
- Bilodeau, P. S., Domsic, J. K., Mayeda, A., Krainer, A. R., et Stoltzfus, C. M. (2001). RNA Splicing at Human Immunodeficiency Virus Type 1 3' Splice Site A2 Is Regulated by Binding of hnRNP A/B Proteins to an Exonic Splicing Silencer Element, *J Virol* 75, 8487-97.
- Black, D. L. (2000). Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology, *Cell* 103, 367-70.
- Blanchette, M., et Chabot, B. (1997). A highly stable duplex structure sequesters the 5' splice site region of hnRNP A1 alternative exon 7B, *RNA* 3, 405-19.
- Blanchette, M., et Chabot, B. (1999). Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization, *EMBO J* 18, 1939-52.
- Bourgeois, C. F., Popielarz, M., Hildwein, G., et Stevenin, J. (1999). Identification of a bidirectional splicing enhancer: differential involvement of SR proteins in 5' or 3' splice site activation, *Mol Cell Biol* 19, 7347-56.
- Cáceres, J. F., Stamm, S., Helfman, D. M., et Krainer, A. R. (1994). Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors, *Science* 265, 1706-9.
- Caputi, M., Mayeda, A., Krainer, A. R., et Zahler, A. M. (1999). hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing, *EMBO J* 18, 4060-7.

- Carstens, R. P., McKeethan, W. L., et Garcia-Blanco, M. A. (1998). An intronic sequence element mediates both activation and repression of rat fibroblast growth factor receptor 2 pre-mRNA splicing, *Mol Cell Biol* *18*, 2205-17.
- Cartegni, L., Maconi, M., Morandi, E., Cobianchi, F., Riva, S., et Biamonti, G. (1996). hnRNP A1 selectively interacts through its Gly-rich domain with different RNA-binding proteins, *J Mol Biol* *259*, 337-48.
- Cavaloc, Y., Bourgeois, C. F., Kister, L., et Stevenin, J. (1999). The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers, *RNA* *5*, 468-83.
- Chabot, B. (1996). Directing alternative splicing: cast and scenarios, *Trends Genet* *12*, 472-8.
- Chabot, B., Blanchette, M., Lapierre, I., et La Branche, H. (1997). An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1, *Mol Cell Biol* *17*, 1776-86.
- Chan, R. C., et Black, D. L. (1995). Conserved intron elements repress splicing of a neuron-specific c-src exon in vitro [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1997 May;17(5):2970], *Mol Cell Biol* *15*, 6377-85.
- Chan, R. C., et Black, D. L. (1997). The polypyrimidine tract binding protein binds upstream of neural cell- specific c-src exon N1 to repress the splicing of the intron downstream, *Mol Cell Biol* *17*, 4667-76.
- Chen, C. D., Kobayashi, R. et Helfman, D. M. (1999). Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene, *Genes & Dev* *13*, 593-606.

- Chew, S. L., Liu, H. X., Mayeda, A., et Krainer, A. R. (1999). Evidence for the function of an exonic splicing enhancer after the first catalytic step of pre-mRNA splicing, *Proc Natl Acad Sci* 96, 10655-60.
- Chou, M. Y., Rooke, N., Turck, C. W., et Black, D. L. (1999). hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells, *Mol Cell Biol* 19, 69-77.
- Chou, M. Y., Underwood, J. G., Nikolic, J., Luu, M. H., et Black, D. L. (2000). Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing, *Mol Cell* 5, 949-57.
- Clouet d'Orval, B., d'Aubenton Carafa, Y., Sirand-Pugnet, P., Gallego, M., Brody, E., et Marie, J. (1991). RNA secondary structure repression of a muscle-specific exon in HeLa cell nuclear extracts, *Science* 252, 1823-8.
- Colwill, K., Feng, L. L., Yeakley, J. M., Gish, G. D., Cáceres, J. F., Pawson, T., et Fu, X. D. (1996). SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors, *J Biol Chem* 271, 24569-75.
- Consortium, I. H. G. S. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 409, 860-921.
- Côté, J., et Chabot, B. (1997). Natural base-pairing interactions between 5' splice site and branch site sequences affect mammalian 5' splice site selection, *RNA* 3, 1248-61.
- Côté, J. (1998). Mécanismes modulant l'épissage alternatif du pré-mRNA de la NCAM murine, Thèse de doctorat.

- Côté, J., Simard, M. J., et Chabot, B. (1999). An element in the 5' common exon of the NCAM alternative splicing unit interacts with SR proteins and modulates 5' splice site selection, *Nucleic Acids Res* *27*, 2529-37.
- Coulter, L. R., Landree, M. A., et Cooper, T. A. (1997). Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection, *Mol Cell Biol* *17*, 2143-50.
- Cramer, P., Pesce, C. G., Baralle, F. E., et Kornblihtt, A. R. (1997). Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing, *Proc Natl Acad Sci* *94*, 11456-60.
- Del Gatto, F., et Breathnach, R. (1995). Exon and intron sequences, respectively, repress and activate splicing of a fibroblast growth factor receptor 2 alternative exon, *Mol Cell Biol* *15*, 4825-34.
- Del Gatto, F., Plet, A., Gesnel, M. C., Fort, C., et Breathnach, R. (1997). Multiple interdependent sequence elements control splicing of a fibroblast growth factor receptor 2 alternative exon, *Mol Cell Biol* *17*, 5106-16.
- Del Gatto-Konczak, F., Bourgeois, C. F., Le Guiner, C., Kister, L., Gesnel, M. C., Stevenin, J., et Breathnach, R. (2000). The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site, *Mol Cell Biol* *20*, 6287-99.
- Del Gatto-Konczak, F., Olive, M., Gesnel, M. C., et Breathnach, R. (1999). hnRNP A1 recruited to an exon In vivo can function as an exon splicing silencer, *Mol Cell Biol* *19*, 251-60.

- Eldridge, A. G., Li, Y., Sharp, P. A., et Blencowe, B. J. (1999). The SRm160/300 splicing coactivator is required for exon-enhancer function, *Proc Natl Acad Sci* 96, 6125-30.
- Elrick, L. L., Humphrey, M. B., Cooper, T. A., et Berget, S. M. (1998). A short sequence within two purine-rich enhancers determines 5' splice site specificity, *Mol Cell Biol* 18, 343-52.
- Eperon, I. C., Ireland, D. C., Smith, R. A., Mayeda, A., et Krainer, A. R. (1993). Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF, *EMBO J* 12, 3607-17.
- Eperon, I. C., Makarova, O. V., Mayeda, A., Munroe, S. H., Caceres, J. F., Hayward, D. G., et Krainer, A. R. (2000). Selection of alternative 5' splice sites: role of U1 snRNP and models for the antagonistic effects of SF2/ASF and hnRNP A1, *Mol Cell Biol* 20, 8303-18.
- Estes, P. A., Cooke, N. E., et Liebhaber, S. A. (1992). A native RNA secondary structure controls alternative splice-site selection and generates two human growth hormone isoforms, *J Biol Chem* 267, 14902-8.
- Fairbrother, W. G., et Chasin, L. A. (2000). Human genomic sequences that inhibit splicing, *Mol Cell Biol* 20, 6816-25.
- Fogel, B. L., et McNally, M. T. (2000). A cellular protein, hnRNP H, binds to the negative regulator of splicing element from Rous sarcoma virus, *J Biol Chem* 275, 32371-8.

- Forch, P., Puig, O., Kedersha, N., Martinez, C., Granneman, S., Seraphin, B., Anderson, P., et Valcarcel, J. (2000). The apoptosis-promoting factor TIA-1 is a regulator of alternative pre- mRNA splicing, *Mol Cell* 6, 1089-98.
- Gallego, M. E., Balvay, L., et Brody, E. (1992). cis-acting sequences involved in exon selection in the chicken beta- tropomyosin gene, *Mol Cell Biol* 12, 5415-25.
- Gallego, M. E., Gattoni, R., Stevenin, J., Marie, J., et Expert-Bezancon, A. (1997). The SR splicing factors ASF/SF2 and SC35 have antagonistic effects on intronic enhancer-dependent splicing of the beta-tropomyosin alternative exon 6A, *EMBO J* 16, 1772-84.
- Gontarek, R. R., McNally, M. T., et Beemon, K. (1993). Mutation of an RSV intronic element abolishes both U11/U12 snRNP binding and negative regulation of splicing, *Genes & Dev* 7, 1926-36.
- Gooding, C., Roberts, G. C., Moreau, G., Nadal-Ginard, B., et Smith, C. W. (1994). Smooth muscle-specific switching of alpha-tropomyosin mutually exclusive exon selection by specific inhibition of the strong default exon, *EMBO J* 13, 3861-72.
- Gooding, C., Roberts, G. C., et Smith, C. W. (1998). Role of an inhibitory pyrimidine element and polypyrimidine tract binding protein in repression of a regulated alpha-tropomyosin exon, *RNA* 4, 85-100.
- Graveley, B. R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions, *RNA* 6, 1197-211.
- Graveley, B. R. (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world, *Trends Genet* 17, 100-7.

- Gui, J. F., Tronchere, H., Chandler, S. D., et Fu, X. D. (1994). Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors, *Proc Natl Acad Sci* *91*, 10824-8.
- Hanamura, A., Caceres, J. F., Mayeda, A., Franza, B. R., Jr., et Krainer, A. R. (1998). Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors, *RNA* *4*, 430-44.
- Hibbert, C. S., Gontarek, R. R., et Beemon, K. L. (1999). The role of overlapping U1 and U11 5' splice site sequences in a negative regulator of splicing, *RNA* *5*, 333-43.
- Hirose, Y., et Manley, J. L. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events, *Genes & Dev* *14*, 1415-29.
- Hirose, Y., Tacke, R., et Manley, J. L. (1999). Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing, *Genes & Dev* *13*, 1234-9.
- Huh, G. S., et Hynes, R. O. (1993). Elements regulating an alternatively spliced exon of the rat fibronectin gene, *Mol Cell Biol* *13*, 5301-14.
- Humphrey, M. B., Bryan, J., Cooper, T. A., et Berget, S. M. (1995). A 32-nucleotide exon-splicing enhancer regulates usage of competing 5' splice sites in a differential internal exon, *Mol Cell Biol* *15*, 3979-88.
- Hutchison, S., Simard, M. J., Nasim, F. H., Cordeau, M., et Chabot, B. (2000). Alternative splicing of hnRNP A1: Complex control of a simple splicing event, *Recent Res Devel Mol Cell Biol* *1*, 117-35.

- Hutchison, S. (2001). Caractérisation de deux éléments introniques modulant l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager du gène de hnRNP A1, Thèse de doctorat.
- Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R. C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J. M., Nowotny, P., Heutink, P., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17, *Nature* 393, 702-5.
- Izaurrealde, E., Jarmolowski, A., Beisel, C., Mattaj, I. W., Dreyfuss, G., et Fischer, U. (1997). A role for the M9 transport signal of hnRNP A1 in mRNA nuclear export, *J Cell Biol* 137, 27-35.
- Jiang, Z. H., Zhang, W. J., Rao, Y., et Wu, J. Y. (1998). Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors, *Proc Natl Acad Sci* 95, 9155-60.
- Kadener, S., Cramer, P., Nogues, G., Cazalla, D., de la Mata, M., Fededa, J. P., Werbajh, S. E., Srebrow, A., et Kornblihtt, A. R. (2001). Antagonistic effects of T-Ag and VP16 reveal a role for RNA pol II elongation on alternative splicing, *EMBO J* 20, 5759-68.
- Kan, J. L., et Green, M. R. (1999). Pre-mRNA splicing of IgM exons M1 and M2 is directed by a juxtaposed splicing enhancer and inhibitor, *Genes & Dev* 13, 462-71.
- Kanopka, A., Mühlemann, O., et Aküsjarvi, G. (1996). Inhibition by SR proteins of splicing of a regulated adenovirus pre-mRNA, *Nature* 381, 535-8.

- Kim, E., Du, L., Bregman, D. B., et Warren, S. L. (1997). Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA, *J Cell Biol* 136, 19-28.
- Kohtz, J. D., Jamison, S. F., Will, C. L., Zuo, P., Lührmann, R., Garcia-Blanco, M. A., et Manley, J. L. (1994). Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors, *Nature* 368, 119-24.
- König, H., Ponta, H., et Herrlich, P. (1998). Coupling of signal transduction to alternative pre-mRNA splicing by a composite splice regulator, *EMBO J* 17, 2904-13.
- Kuo, B. A., et Norton, P. A. (1999). Accurate selection of a 5' splice site requires sequences within fibronectin alternative exon B, *Nucleic Acids Res* 27, 3945-3952.
- Labourier, E., Allemand, E., Brand, S., Fostier, M., Tazi, J., et Bourbon, H. M. (1999a). Recognition of exonic splicing enhancer sequences by the *Drosophila* splicing repressor RSF1, *Nucleic Acids Res* 27, 2377-86.
- Labourier, E., Bourbon, H. M., Gallouzi, I. E., Fostier, M., Allemand, E., et Tazi, J. (1999b). Antagonism between RSF1 and SR proteins for both splice-site recognition in vitro and *Drosophila* development, *Genes & Dev* 13, 740-53.
- LaBranche, H., Dupuis, S., Ben-David, Y., Bani, M. R., Wellinger, R. J., et Chabot, B. (1998). Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase, *Nat Genet* 19, 199-202.
- Lavigne, A., La Branche, H., Kornblihtt, A. R., et Chabot, B. (1993). A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding, *Genes & Dev* 7, 2405-17.

- Le Guiner, C., Lejeune, F., Galiana, D., Kister, L., Breathnach, R., Stevenin, J., et Del Gatto-Konczak, F. (2001). TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs, *J Biol Chem* 20, 20.
- Li, Y., et Blencowe, B. J. (1999). Distinct factor requirements for exonic splicing enhancer function and binding of U2AF to the polypyrimidine tract, *J Biol Chem* 274, 35074-9.
- Lin, C. H., et Patton, J. G. (1995). Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors, *RNA* 1, 234-45.
- Liu, H. X., Chew, S. L., Cartegni, L., Zhang, M. Q., et Krainer, A. R. (2000). Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions, *Mol Cell Biol* 20, 1063-71.
- Liu, H. X., Zhang, M., et Krainer, A. R. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins, *Genes & Dev* 12, 1998-2012.
- Lopez, A. J. (1998). Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation, *Annu Rev Genet* 32, 279-305.
- Lou, H., et Gagel, R. F. (1998). Alternative RNA processing--its role in regulating expression of calcitonin/calcitonin gene-related peptide, *J Endocrinol* 156, 401-5.
- Lou, H., Helfman, D. M., Gagel, R. F., et Berget, S. M. (1999). Polypyrimidine tract-binding protein positively regulates inclusion of an alternative 3'-terminal exon, *Mol Cell Biol* 19, 78-85.

- Lou, H., Yang, Y., Cote, G. J., Berget, S. M., et Gagel, R. F. (1995). An intron enhancer containing a 5' splice site sequence in the human calcitonin/calcitonin gene-related peptide gene, *Mol Cell Biol* 15, 7135-42.
- Mardon, H. J., Sebastio, G., et Baralle, F. E. (1987). A role for exon sequences in alternative splicing of the human fibronectin gene, *Nucleic Acids Res* 15, 7725-33.
- Maroney, P. A., Romfo, C. M., et Nilsen, T. W. (2000). Functional recognition of 5' splice site by U4/U6.U5 tri-snRNP defines a novel ATP-dependent step in early spliceosome assembly, *Mol Cell* 6, 317-28.
- Matter, N., Marx, M., Weg-Remers, S., Ponta, H., Herrlich, P., et Konig, H. (2000). Heterogeneous ribonucleoprotein A1 is part of an exon-specific splice- silencing complex controlled by oncogenic signaling pathways, *J Biol Chem* 275, 35353-60.
- Mayeda, A., et Krainer, A. R. (1992). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2, *Cell* 68, 365-75.
- Mayeda, A., Munroe, S. H., Cáceres, J. F., et Krainer, A. R. (1994). Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins, *EMBO J* 13, 5483-95.
- Mayeda, A., Screaton, G. R., Chandler, S. D., Fu, X. D., et Krainer, A. R. (1999). Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements, *Mol Cell Biol* 19, 1853-63.
- McNally, L. M., et McNally, M. T. (1996). SR protein splicing factors interact with the Rous sarcoma virus negative regulator of splicing element, *J Virol* 70, 1163-72.

- McNally, L. M., et McNally, M. T. (1998). An RNA splicing enhancer-like sequence is a component of a splicing inhibitor element from Rous sarcoma virus, *Mol Cell Biol* 18, 3103-11.
- Merendino, L., Guth, S., Bilbao, D., Martinez, C., et Valcarcel, J. (1999). Inhibition of msl-2 splicing by Sex-lethal reveals interaction between U2AF35 and the 3' splice site AG, *Nature* 402, 838-41.
- Michael, W. M., Choi, M., et Dreyfuss, G. (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature- dependent nuclear protein export pathway, *Cell* 83, 415-22.
- Min, H., Chan, R. C., et Black, D. L. (1995). The generally expressed hnRNP F is involved in a neural-specific pre- mRNA splicing event, *Genes & Dev* 9, 2659-71.
- Misteli, T., Cáceres, J. F., et Spector, D. L. (1997). The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells, *Nature* 387, 523-7.
- Misteli, T., et Spector, D. L. (1999). RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo, *Mol Cell* 3, 697-705.
- Modafferi, E. F., et Black, D. L. (1999). Combinatorial control of a neuron-specific exon, *RNA* 5, 687-706.
- Mortillaro, M. J., Blencowe, B. J., Wei, X., Nakayasu, H., Du, L., Warren, S. L., Sharp, P. A., et Berezney, R. (1996). A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix, *Proc Natl Acad Sci* 93, 8253-7.
- Nayler, O., Stratling, W., Bourquin, J. P., Stagljar, I., Lindemann, L., Jasper, H., Hartmann, A. M., Fackelmayer, F. O., Ullrich, A., et Stamm, S. (1998). SAF-B

- protein couples transcription and pre-mRNA splicing to SAR/MAR elements, *Nucleic Acids Res* 26, 3542-9.
- Paca, R. E., Hibbert, C. S., O'Sullivan, C. T., et Beemon, K. L. (2001). Retroviral splicing suppressor requires three nonconsensus uridines in a 5' splice site-like sequence, *J Virol* 75, 7763-8.
- Perez, I., Lin, C. H., McAfee, J. G., et Patton, J. G. (1997). Mutation of PTB binding sites causes misregulation of alternative 3' splice site selection in vivo, *RNA* 3, 764-78.
- Petersen-Mahrt, S. K., Estmer, C., Ohrmalm, C., Matthews, D. A., Russell, W. C., et Akusjarvi, G. (1999). The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation, *EMBO J* 18, 1014-24.
- Proudfoot, N. (2000). Connecting transcription to messenger RNA processing, *Trends Biochem Sci* 25, 290-3.
- Puig, O., Gottschalk, A., Fabrizio, P., et Seraphin, B. (1999). Interaction of the U1 snRNP with nonconserved intronic sequences affects 5' splice site selection, *Genes & Dev* 13, 569-80.
- Reed, R. (1996). Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing, *Curr Opin Genet Dev* 6, 215-20.
- Rossi, F., Labourier, E., Forne, T., Divita, G., Derancourt, J., Riou, J. F., Antoine, E., Cathala, G., Brunel, C., et Tazi, J. (1996). Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I, *Nature* 381, 80-2.

- Ryan, K. J., et Cooper, T. A. (1996). Muscle-specific splicing enhancers regulate inclusion of the cardiac troponin T alternative exon in embryonic skeletal muscle, *Mol Cell Biol* *16*, 4014-23.
- Sanford, J. R., et Bruzik, J. P. (1999). Developmental regulation of SR protein phosphorylation and activity, *Genes & Dev* *13*, 1513-8.
- Schaal, T. D., et Maniatis, T. (1999a). Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA, *Mol Cell Biol* *19*, 261-73.
- Schaal, T. D., et Maniatis, T. (1999b). Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences, *Mol Cell Biol* *19*, 1705-19.
- Screaton, G. R., Cáceres, J. F., Mayeda, A., Bell, M. V., Plebanski, M., Jackson, D. G., Bell, J. I., et Krainer, A. R. (1995). Identification and characterization of three members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors, *EMBO J* *14*, 4336-49.
- Selvakumar, M., et Helfman, D. M. (1999). Exonic splicing enhancers contribute to the use of both 3' and 5' splice site usage of rat beta-tropomyosin pre-mRNA, *RNA* *5*, 378-94.
- Simard, M. J., et Chabot, B. (2000). Control of hnRNP A1 alternative splicing: an intron element represses use of the common 3' splice site, *Mol Cell Biol* *20*, 7353-62.

- Singh, R., Valcárcel, J., et Green, M. R. (1995). Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins, *Science* 268, 1173-6.
- Smith, C. W., et Valcarcel, J. (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control, *Trends Biochem Sci* 25, 381-8.
- Southby, J., Gooding, C., et Smith, C. W. (1999). Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons, *Mol Cell Biol* 19, 2699-711.
- Staffa, A., et Cochrane, A. (1995). Identification of positive and negative splicing regulatory elements within the terminal tat-rev exon of human immunodeficiency virus type 1, *Mol Cell Biol* 15, 4597-605.
- Staknis, D., et Reed, R. (1994). SR proteins promote the first specific recognition of Pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex, *Mol Cell Biol* 14, 7670-82.
- Stickeler, E., Fraser, S. D., Honig, A., Chen, A. L., Berget, S. M., et Cooper, T. A. (2001). The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4, *EMBO J* 20, 3821-30.
- Stoss, O., Olbrich, M., Hartmann, A. M., Konig, H., Memmott, J., Andreadis, A., et Stamm, S. (2001). The STAR/GSG Family Protein rSLM-2 Regulates the Selection of Alternative Splice Sites, *J Biol Chem* 276, 8665-73.
- Stoss, O., Schwaiger, F. W., Cooper, T. A., et Stamm, S. (1999). Alternative splicing determines the intracellular localization of the novel nuclear protein Nop30 and its interaction with the splicing factor SRp30c, *J Biol Chem* 274, 10951-62.

- Tacke, R., Chen, Y., et Manley, J. L. (1997). Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: creation of an SRp40-specific splicing enhancer, *Proc Natl Acad Sci* *94*, 1148-53.
- Tacke, R., et Manley, J. L. (1995). The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities, *EMBO J* *14*, 3540-51.
- van Oers, C. C., Adema, G. J., Zandberg, H., Moen, T. C., et Baas, P. D. (1994). Two different sequence elements within exon 4 are necessary for calcitonin-specific splicing of the human calcitonin/calcitonin gene-related peptide I pre-mRNA, *Mol Cell Biol* *14*, 951-60.
- Vincent, M., Lauriault, P., Dubois, M. F., Lavoie, S., Bensaude, O., et Chabot, B. (1996). The nuclear matrix protein p255 is a highly phosphorylated form of RNA polymerase II largest subunit which associates with spliceosomes, *Nucleic Acids Res* *24*, 4649-52.
- Wang, H. Y., Lin, W., Dyck, J. A., Yeakley, J. M., Songyang, Z., Cantley, L. C., et Fu, X. D. (1998). SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells, *J Cell Biol* *140*, 737-50.
- Wang, J., et Manley, J. L. (1995). Overexpression of the SR proteins ASF/SF2 and SC35 influences alternative splicing in vivo in diverse ways, *RNA* *1*, 335-46.
- Wang, Z., Hoffmann, H. M., et Grabowski, P. J. (1995). Intrinsic U2AF binding is modulated by exon enhancer signals in parallel with changes in splicing activity, *RNA* *1*, 21-35.

- Wu, J. Y., et Maniatis, T. (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing, *Cell* 75, 1061-70.
- Wu, S., Romfo, C. M., Nilsen, T. W., et Green, M. R. (1999). Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35, *Nature* 402, 832-5.
- Xiao, S. H., et Manley, J. L. (1997). Phosphorylation of the ASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing, *Genes & Dev* 11, 334-44.
- Xiao, S. H., et Manley, J. L. (1998). Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2, *EMBO J* 17, 6359-67.
- Yang, X., Bani, M. R., Lu, S. J., Rowan, S., Ben-David, Y., et Chabot, B. (1994). The A1 and A1^b proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoparticles modulate 5' splice site selection in vivo, *Proc Natl Acad Sci* 91, 6924-8.
- Yeakley, J. M., Hedjran, F., Morfin, J. P., Merillat, N., Rosenfeld, M. G., et Emeson, R. B. (1993). Control of calcitonin/calcitonin gene-related peptide pre-mRNA processing by constitutive intron and exon elements, *Mol Cell Biol* 13, 5999-6011.
- Yeakley, J. M., Tronchere, H., Olesen, J., Dyck, J. A., Wang, H. Y., et Fu, X. D. (1999). Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors, *J Cell Biol* 145, 447-55.
- Yuan, Y., Li, D. M., et Sun, H. (1998). PIR1, a novel phosphatase that exhibits high affinity to RNA . ribonucleoprotein complexes, *J Biol Chem* 273, 20347-53.
- Yuryev, A., Patturajan, M., Litingtung, Y., Joshi, R. V., Gentile, C., Gebara, M., et Corden, J. L. (1996). The C-terminal domain of the largest subunit of RNA

- polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins, *Proc Natl Acad Sci* 93, 6975-80.
- Zahler, A. M., Lane, W. S., Stolk, J. A., et Roth, M. B. (1992). SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors, *Genes & Dev* 6, 837-47.
- Zhang, L., Ashiya, M., Sherman, T. G., et Grabowski, P. J. (1996). Essential nucleotides direct neuron-specific splicing of gamma 2 pre- mRNA, *RNA* 2, 682-98.
- Zhang, L., Liu, W., et Grabowski, P. J. (1999). Coordinate repression of a trio of neuron-specific splicing events by the splicing regulator PTB, *RNA* 5, 117-30.
- Zorio, D. A., et Blumenthal, T. (1999). Both subunits of U2AF recognize the 3' splice site in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 402, 835-8.

ANNEXE I

J. Côté, **M.J. Simard** and B. Chabot. (1999) An element in the 5' common exon of the NCAM alternative splicing unit interacts with SR proteins and modulates 5' splice site selection. Nucleic Acids Research **27**(12): 2529-2537.

Préambule

Ce manuscrit décrit l'identification d'une région régulatrice située dans l'exon constitutif E17 du gène NCAM. *In vivo*, cette région favorise l'exclusion de l'exon alternatif E18 dans les cellules neuronales. *In vitro* elle permet l'utilisation du site d'épissage 5' de l'exon E17. De plus, nous avons identifié que les résidus purines de la région régulatrice sont liés par les protéines SR et que cette liaison est nécessaire pour son activité. Cet article identifie une région régulatrice d'un exon constitutif qui est importante pour contrôler l'épissage de l'exon alternatif situé en aval. Dans ce manuscrit, j'ai réalisé certaines expériences d'épissage *in vitro* (Figure 6C et Figure 7).

L'article publié a été retiré de la thèse (pp. 114-122)

ANNEXE II

L.F. Fang, **M.J. Simard**, D. Vidaud, B. Assouline, B. Lemieux, M. Vidaud, B. Chabot and J.-P. Thirion. (2001) A novel mutation in the Neurofibromatosis type 1 (NF1) gene promotes skipping of two exons by preventing exon definition. Journal of Molecular Biology **307** : 1261-1270.

Préambule

Ce manuscrit décrit l'identification d'une mutation ponctuelle retrouvée chez un patient au site d'épissage 5' de l'exon 12a du gène *NF1* (neurofibromatose de type 1). En utilisant un minigène artificiel *in vivo*, nous avons montré que cette mutation favorise non seulement l'exclusion de l'exon 12a mais aussi l'exclusion de l'exon 11 situé en amont. Des études *in vitro* ont permis de montrer que la mutation au site d'épissage 5' de l'exon 12a empêche la reconnaissance du site d'épissage 3' de l'exon. Cette étude a permis de montrer l'importance de mécanisme de définition de l'exon *in vivo* et suggère que la région de *NF1* contenant les exons 11 et 12a est importante pour l'activité de la neurofibromine. Pour cet article, j'ai mené les expériences d'épissage et de formation de complexes *in vitro*. De plus, j'ai collaboré à la conception et à la réalisation des expériences *in vivo*. Finalement, j'ai contribué à la rédaction du manuscrit.

L'article publié a été retiré de la thèse (pp. 124-133)
